

N° D'ORDRE : 338

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER
FACULTÉ DE PHARMACIE

SUR UNE RÉACTION QUANTITATIVE DE FIXATION
DU COMPLÈMENT TITRÉ A 50 0/0 D'HÉMOLYSE
APPLICATION A L'ÉTUDE DES COURBES SYPHILIMÉTRIQUES

THÈSE

PRÉSENTÉE ET PUBLIQUEMENT SOUTENUE DEVANT LA FACULTÉ DE PHARMACIE
LE 14 NOVEMBRE 1950

PAR

PIERRE ROULIER

POUR OBTENIR LE TITRE DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ « MENTION PHARMACIE »

JURY {	MM. BESSIÈRE... Professeur.	{	<i>Président.</i>
	SUSPLUGAS. Professeur.		<i>Assesseurs.</i>
	EMBERGER.. Professeur à la Faculté des Sciences de Mont- pellier.		

LAVAL
IMPRIMERIE BARNÉOUD

1951

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER
FACULTÉ DE PHARMACIE

Nom du candidat : **ROULIER.**
Prénom : **Pierre.**

Date de la soutenance : 14 novembre 1950.

Numéro d'ordre : 338.

ROULIER (Pierre). — Sur une réaction quantitative de fixation du complément titré à 50 o/o d'hémolyse. Application à l'étude des courbes syphilimétriques. *Laval, Imprimerie Barnéoud, 1951. In-8°, 61 p., 10 fig.*

Thèse pharmacie, Montpellier, 1950, N° 338.

ROULIER (Pierre). — Sur une réaction quantitative de fixation du complément titré à 50 o/o d'hémolyse. Application à l'étude des courbes syphilimétriques. *Laval, Imprimerie Barnéoud, 1951. In-8°, 61 p., 10 fig.*

Thèse pharmacie, Montpellier, 1950, N° 338.

ROULIER (Pierre). — Sur une réaction quantitative de fixation du complément titré à 50 o/o d'hémolyse. Application à l'étude des courbes syphilimétriques. *Laval, Imprimerie Barnéoud, 1951. In-8°, 61 p., 10 fig.*

Thèse pharmacie, Montpellier, 1950, N° 338.

ROULIER (Pierre). — Sur une réaction quantitative de fixation du complément titré à 50 o/o d'hémolyse. Application à l'étude des courbes syphilimétriques. *Laval, Imprimerie Barnéoud, 1951. In-8°, 61 p., 10 fig.*

Thèse pharmacie, Montpellier, 1950, N° 338.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER
FACULTÉ DE PHARMACIE

SUR UNE RÉACTION QUANTITATIVE DE FIXATION
DU COMPLÈMENT TITRÉ A 50 0/0 D'HÉMOLYSE

APPLICATION A L'ÉTUDE DES COURBES SYPHILIMÉTRIQUES

THÈSE

PRÉSENTÉE ET PUBLIQUEMENT SOUTENUE DEVANT LA FACULTÉ DE PHARMACIE
LE 14 NOVEMBRE 1950

PAR

PIERRE ROULIER

POUR OBTENIR LE TITRE DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ « MENTION PHARMACIE »

JURY	{	MM. BESSIÈRE... Professeur.	{	<i>Président.</i>
		SUSPLUGAS. Professeur.		<i>Assesseurs.</i>
		EMBERGER.. Professeur à la Faculté des Sciences de Mont- pellier.		

LAVAL
IMPRIMERIE BARNÉOUD

1951

FACULTÉ DE PHARMACIE DE MONTPELLIER

PERSONNEL ENSEIGNANT

MM. CANALS (Et.), Professeur-Doyen.
JAULMES (Paul), Professeur.
DOLIQUE (Roger), Prof.-Assesseur.
GIROUX, Professeur.

GRANGER (Robert), Professeur.
CASTEL (Pierre), Professeur.
MONNIER (Pierre), Professeur.
SUSPLUGAS (Jean), Professeur.
BESSIERE (Clément), Professeur.

CHAIRES

Physique.
Chimie analytique et Toxicologie.
Chimie minérale et Pharmacie industrielle.
Pharmacie galénique et Pharmacodynamie.
Chimie organique pharmaceutique.
Pharmacie chimique.
Chimie biologique.
Botanique et Matière médicale.
Zoologie et Microbiologie.

MAITRES DE CONFÉRENCES

Mme HOLLANDE (Germaine). Sciences naturelles.
M. MARIGNAN (Roger). Sciences physico-chimiques.

CHARGÉS DE COURS COMPLÉMENTAIRES ET CONFÉRENCES

MM. CANALS (E.), Professeur-Doyen. Hydrologie.
JAULMES (P.), Professeur. Toxicologie et C. E. S. Bromatologie.
DOLIQUE (R.), Prof.-Assesseur. Pharmacie industrielle.
GIROUX (J.), Professeur. Pharmacodynamie.
GRANGER (R.), Professeur. } Chimie physique.
MARIGNAN (R.), M^e de Conf. }
MONNIER (P.), Professeur. } Physiologie et C. E. S. Chimie biologique.
MARIGNAN (R.), M^e de Conf. }
SUSPLUGAS (J.), Professeur. Botanique, Cryptogamie et C. E. S. Microbiologie.

BESSIERE (C.), Professeur. Zoologie et C. E. S. Microbiologie.
MARIGNAN (R.), M^e de Conf. Hygiène.
ASTRUC (L.), Chargé de Cours. Législation et Déontologie pharmaceutiques.

DIACONO (Hector), Chargé de Cours. Sérologie.

CHEFS DE TRAVAUX

MM. LALAUURIE (Marc). Histoire naturelle.
LIQUIERE (Georges). Chimie.
MESTRES (Robert). Chimie.
Mlle BARDET (Lucette). Physique.
M. HUGUET (Robert). Histoire naturelle.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. MASSOL et A. ASTRUC, Doyens.
MOUSSERON, FAUCON, HOLLANDE, Professeurs.

MAITRE DE CONFÉRENCES HONORAIRE

M. FARRE.

SECRÉTARIAT

MM. CANALS (Etienne), Doyen.
TOURRETTE (Gaston), Secrétaire.
AMILHAT (Henri), Commis.



A MON PÈRE

A MONSIEUR LE DOCTEUR LAPORTE
Chef de Service à l'Institut Pasteur

A MONSIEUR LE PROFESSEUR BESSIÈRE

A MONSIEUR LE PROFESSEUR SUSPLUGAS

A MONSIEUR LE PROFESSEUR EMBERGER

A MES MAÎTRES DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE MONTPELLIER
ET DE L'INSTITUT PASTEUR

AVANT-PROPOS

Le présent mémoire que j'ai l'honneur de soumettre à la Faculté de Pharmacie de Montpellier a été inspiré par M. le Docteur R. LAPORTE, Chef de Service à l'Institut Pasteur, au cours du stage que j'ai eu le privilège de faire auprès de lui. Pendant toute la durée de mes recherches, M. LAPORTE a été pour moi le meilleur et le plus bienveillant des Maîtres. Je suis heureux de lui exprimer ici ma respectueuse et profonde gratitude.

Je n'aurais pu profiter pleinement de mon séjour à l'Institut Pasteur si je n'avais déjà reçu préalablement une préparation solide au cours de mes études pharmaceutiques à Montpellier. Il m'est particulièrement agréable de remercier tous mes Maîtres en la personne de MM. les Professeurs BESSIERE et SUSPLUGAS, devant lesquels j'ai l'honneur de soutenir ma thèse. Que M. L. EMBERGER, Correspondant de l'Institut, Professeur à la Faculté des Sciences, me permette de l'associer à mes Maîtres de la Faculté de Pharmacie et de lui exprimer aujourd'hui ma reconnaissance pour l'affection fidèle qu'il ne cesse de me témoigner depuis toujours.

Les recherches qui sont exposées ici n'auraient pu être conduites à leur terme, si je n'avais pas bénéficié encore d'autres concours bienveillants :

M. le Professeur TRÉFOUEL, Membre de l'Institut et de l'Académie de Médecine, Directeur de l'Institut Pasteur, a bien voulu m'autoriser à faire mes recherches dans le célèbre Institut qu'il dirige ;

MM. les Chefs de Service de l'Institut Pasteur dont j'ai suivi les enseignements des Cours de Microbiologie et de Sérologie et auxquels je dois beaucoup ;

M. le Professeur BUGNARD, Directeur de l'Institut National d'Hygiène, qui a bien voulu m'agréer comme Stagiaire de Recherches et accepter le présent mémoire dans le « Recueil des Travaux de l'Institut National d'Hygiène ».

Je prie tous ces Maîtres de recevoir l'expression de ma profonde et respectueuse gratitude.

SUR UNE RÉACTION QUANTITATIVE DE FIXATION
DU COMPLÉMENT (TITRÉ A 50 0/0 D'HÉMOLYSE).
APPLICATION A L'ÉTUDE
DES COURBES SYPHILIMÉTRIQUES

par Pierre ROULIER

Stagiaire de Recherches de l'Institut National d'Hygiène.

*(Travail effectué à l'Institut Pasteur
dans le Service du D^r R. LAPORTE).*

INTRODUCTION

On connaît l'importance de la réaction de fixation du complément de Bordet et Gengou comme technique d'analyse sérologique. Sous le nom de réaction de Bordet-Wassermann elle est universellement utilisée pour effectuer le séro-diagnostic de la syphilis. Là ne se limite d'ailleurs pas son emploi : la tuberculose, la gonococcie, les maladies à virus comme la grippe, les rickettsioses, ... trouvent en elle un excellent moyen de diagnostic. Nous ne parlons pas de ses applications dans la recherche scientifique, une des dernières en date étant le titrage des sérums anti-organes dont on connaît la vogue actuelle.

Une difficulté se présente lorsqu'on utilise la réaction de fixation du complément pour la mesure d'un antigène ou d'un anticorps. C'est qu'en raison du nombre élevé de facteurs entrant en jeu dans cette réaction son expression quantitative est difficile à mettre au point. Nombre de causes inconnues peuvent modifier l'intensité de la fixation du complément indépendamment du mécanisme de fixation spécifique. Cela explique pourquoi les techniques anciennes de la réaction de Bordet et Gengou manquaient de la précision que possèdent d'autres réactions sérologiques comme celles de précipitation et d'agglutination. Mais la réaction de fixation du complément se distingue par une grande sensibilité, ses applications sont plus étendues que celles des réactions de précipitation et d'agglutination qui ne s'adressent qu'à des types particuliers d'antigènes. Il paraît donc nécessaire

de poursuivre plus avant l'étude de son mécanisme afin d'élaborer une technique quantitative rationnelle et réellement précise, susceptible de nombreuses applications dont, en premier lieu, le séro-diagnostic quantitatif de la syphilis. On sait, en effet, que de plus en plus, la conduite rationnelle du traitement de la syphilis (en particulier par les antibiotiques) doit être guidée par l'évolution de la courbe sérologique quantitative.

Avant de commencer cette étude, il nous paraît nécessaire de rappeler quelques notions sur :

- 1° le complément ;
- 2° la réaction d'hémolyse sérique qui permet de mettre en évidence la fixation du complément ;
- 3° le principe même de la réaction de Bordet et Gengou.

LE COMPLÉMENT

L'élément essentiel de la réaction de Bordet et Gengou est le complément. Qu'est-ce donc que cette substance un peu mystérieuse ou plutôt ce groupe de substances, puisqu'on connaît au moins quatre facteurs différents dont l'action combinée explique l'effet complémentaire du sérum sanguin frais ?

On appelle *complément* (Erich) ou *alexine* (Buchner) un ensemble de substances contenues dans tous les sérums qui complètent l'action de certains anticorps tels les hémolysines et bactériolysines. Cette action complémentaire déclenche la lyse des hématies ou des bactéries sensibilisées par l'anticorps spécifique. Indépendamment de cette action complémentaire, l'alexine est aussi capable de se fixer sur la plupart des complexes antigène-anticorps. De ces propriétés, c'est l'action du complément sur les hématies sensibilisées par l'hémolysine qui constitue celle se prêtant le mieux à son étude (Bordet). On s'est, par exemple, très vite aperçu que cette propriété disparaissait lorsqu'on soumet les sérums frais à des traitements physiques ou chimiques variés et cela a permis de différencier les substances entrant en jeu dans l'action complémentaire, l'absence d'une seule d'entre elles suffisant pour faire disparaître toute activité. En précipitant les euglobulines du sérum frais (par dilution dans l'eau distillée légèrement acide), on divise le complément en deux parties :

- une fraction dite « euglobulinique » qui précipite (appelée aussi chaînon intermédiaire ou *mid-piece*) ;
- une fraction qui reste dissoute, dite à tort « albuminique » (chaînon terminal ou *end-piece*).

La réunion des deux chaînons reconstitue le complément actif, chacun d'eux étant démuné de toute activité.

On peut donc déjà considérer que le complément est constitué par au moins deux composants : le chaînon intermédiaire et le chaînon terminal. Poussant plus loin cette analyse les auteurs modernes dénombrent quatre composants du complément désignés sous les symboles : C/1, C/2, C/3 et C/4.

C/1 se retrouve en entier dans le chaînon intermédiaire, C/2 passe en totalité dans le chaînon terminal. Ces deux premiers composants sont détruits par le chauffage du sérum frais pendant 30 minutes à 56° (inactivation). Mais il existe aussi deux autres composants qui résistent à ce traitement, ce sont les troisième et quatrième composants (C/3 et C/4) ; C/3 se trouve surtout dans le chaînon intermédiaire et C/4 passe en totalité dans le chaînon terminal.

Les deux composants thermo-stables se différencient d'après les substances qui les détruisent. C/3 est détruit par la zymase de la levure [1] ou par le venin de cobra [2], C/4 l'est par l'ammoniaque [3] ou les amines primaires [4].

L'action de ces diverses substances sur le sérum frais fait disparaître l'activité complémentaire qui réapparaît lorsqu'on ajoute du sérum inactivé par chauffage à 56°.

Des recherches récentes poursuivies par Ecker, Pillemer, Oncley et Cohn [5-6] ont permis d'élucider en grande partie la nature chimique des quatre composants. Ces auteurs obtinrent C/1, C/2 et C/4 à l'état purifié sous forme de protéines bien définies, en opérant par précipitation fractionnée du sérum de cobaye par le sulfate d'ammonium et dialyse. C/1 est une globuline dont la constante de sédimentation est de 6,4 et le point iso-électrique de pH 5,2-5,4. C/2 et C/4 n'ont pu être séparés et constituent une muco-euglobuline apparemment pure et contenant 10,3 o/o de glucides, avec un point iso-électrique de 6,3-6,4. C/3 se retrouve dans toutes les fractions et semble être un phospho-lipide ou une phospho-protéine.

PRINCIPE DE LA RÉACTION D'HÉMOLYSE SÉRIQUE

La réaction d'hémolyse sérique, c'est-à-dire l'hémolyse des hématies d'une espèce animale par un immun-sérum provenant d'une autre espèce est démonstrative du rôle du complément. On en connaît le principe (Bordet) [7] : si l'on prépare (par injections successives) un lapin ou un cheval contre des hématies de mouton, on obtient, après un certain temps, un sérum qui, à l'état frais (c'est-à-dire contenant du complément), lyse les

hématies de mouton. Ce sérum, chauffé pendant 30 minutes à 56°, perd sa propriété hémolytique, mais la récupère si on ajoute du complément sous forme de sérum frais d'un animal quelconque : en pratique on utilise surtout le sérum de cobaye et la réaction se fait dans les conditions optimales si on opère à 37°. On appelle globules rouges sensibilisés des hématies traitées par du sérum hémolytique, décomplémenté, correspondant à l'espèce animale qui a fourni les globules : par exemple globules de mouton traités par un sérum hémolytique chauffé de lapin anti-mouton. Ces globules sensibilisés ont fixé l'anticorps hémolytique et sont utilisés en sérologie comme révélateur de la présence de complément qui seul peut déclencher la lyse de ces globules imprégnés de l'anticorps (que l'on appelle aussi hémolysine, sensibilisatrice ou ambocepteur).

PRINCIPE DE LA RÉACTION DE FIXATION DU COMPLÉMENT

Grâce à cette réaction d'hémolyse, Bordet et Gengou [8] ont mis au point la *réaction de fixation du complément* dont le but est de *déceler* dans un sérum la présence d'un anticorps correspondant à un antigène déterminé. Le principe de cette réaction est classique, nous l'exposerons donc d'une manière succincte. La réaction consiste à mettre en présence l'antigène, le sérum à étudier et le complément (sérum frais de cobaye) : deux cas peuvent alors se présenter :

1° Si le sérum contient l'anticorps : l'anticorps et l'antigène réagissent l'un sur l'autre et forment un complexe qui peut être directement visible (agglutination, floculation) mais peut aussi rester invisible (ou nécessiter pour être rendu visible l'emploi d'un système optique particulier). Mais en général, le complexe formé, jouit de la propriété remarquable de fixer le complément présent dans le milieu. Cette propriété est utilisée dans le premier temps de la réaction, ou temps de fixation. La fixation du complément peut être alors mise en évidence, dans un deuxième temps, par addition au milieu de globules rouges sensibilisés : le complément ayant disparu, l'hémolyse ne se produit pas : la réaction est dite positive.

2° Si le sérum ne contient pas l'anticorps recherché, le complexe ne se forme pas et le complément n'est pas fixé dans le premier temps de la réaction. L'hémolyse des hématies sensibilisées ajoutées au milieu est donc possible dans le deuxième temps de la réaction : la réaction est dite négative.

Lorsque la réaction est positive, la dose de complément fixé est d'autant plus grande que la quantité de complexe antigène-anticorps formé est plus importante. C'est là le principe de la mesure de l'anticorps contenu dans

un sérum, et dans cette réaction quantitative, le complément et l'antigène doivent être apportés en quantités connues et exactement mesurées. En effet :

a) Comme dans toute réaction de fixation du complément, il importe avant tout de titrer le *complément*, substance complexe et instable dont la composition et l'activité hémolytique vis-à-vis des globules rouges de mouton sensibilisés varient chez les différents cobayes et d'un jour à l'autre chez le même individu. Mais dans la réaction quantitative ce titrage doit être particulièrement précis puisque c'est la quantité de complément fixé qui permet de mesurer l'activité fixatrice du complexe antigène-anticorps. Le principe du titrage reste néanmoins le même, il consiste à mesurer l'activité hémolytique du complément en présence d'une dose fixe d'hématies de mouton sensibilisées par une dose déterminée d'hémolysine correspondante.

b) Le complément se fixe sur un complexe antigène-anticorps dont la formation est, comme toutes les réactions antigène-anticorps, sujette à des phénomènes d'inhibition plus ou moins nette par excès de l'un ou de l'autre de ces deux éléments. L'*antigène* devra donc être *titré* afin d'en employer la dose optima dans la réaction.

c) Quant à l'*anticorps*, qui en général est l'élément à mesurer, ses variations quantitatives obligent à multiplier les tubes de réaction afin de déterminer celui où sont réalisées les conditions optima de formation du complexe antigène-anticorps et de fixation du complément sur ce complexe, c'est-à-dire le tube où la fixation du complément sera maxima. On calcule ainsi le titre du sérum qui, comme nous le montrerons, est l'expression d'une relation linéaire entre le nombre d'unités de complément fixées et la quantité d'anticorps.

Ces considérations dominent l'établissement d'un schéma pour une étude rationnelle de la réaction quantitative de fixation du complément.

— Dans une première partie, nous étudierons la réaction d'hémolyse, proprement dite et nous décrirons une méthode précise de titrage du complément permettant de définir une unité de mesure du complément : l'unité 50 o/o.

— En utilisant le complément ainsi titré nous pourrions alors évaluer exactement la richesse en anticorps d'un sérum soumis à la réaction quantitative dont nous décrirons la technique dans la deuxième partie de cet exposé.

Enfin nous montrerons à l'aide de quelques exemples l'intérêt de cette technique pour suivre l'évolution de la courbe syphilométrique d'un malade.

PREMIÈRE PARTIE

LA RÉACTION D'HÉMOLYSE.

TITRAGE DU COMPLÉMENT A 50 0/0 D'HÉMOLYSE

Le titrage du complément est basé sur la propriété que possède l'alexine de lyser les globules rouges de mouton sensibilisés par une hémolysine anti-mouton. On appelle classiquement *unité*, la plus petite quantité de complément (exprimée en volume de sérum frais, pur ou dilué) capable d'hémolyser *totalement*, à 37° et dans un temps donné, une quantité fixe d'hématies de mouton sensibilisées.

Dans une série de tubes on introduit le complément à doses croissantes et les globules rouges sensibilisés à dose fixe. La lecture des résultats se fait en appréciant à l'œil nu la différence entre le premier tube où l'hémolyse est totale et le dernier tube où l'hémolyse est incomplète, ce qui se traduit par la persistance d'un trouble, l'unité est le volume de K contenu dans le premier tube parfaitement clair. Mais les travaux sur l'hémolyse de Von Krogh [9], Morse [10], etc... montrèrent que l'unité 50 0/0 ou quantité de complément capable d'hémolyser dans les mêmes conditions 50 0/0 des hématies de mouton sensibilisées, pouvait être déterminée avec beaucoup plus de précision que l'unité classique dont nous venons de parler (et que l'on peut appeler par opposition unité 100 0/0).

En effet, on voit sur la courbe d'hémolyse (courbe de Gauss, en forme de S) exprimant les variations du pourcentage d'hémolyse en fonction de l'augmentation du volume de complément utilisé, que le point 50 0/0 est le point d'inflexion de la courbe : c'est aux alentours de ce point que pour une variation ΔK du volume de complément utilisé, la variation ΔH du pourcentage d'hémolyse est maxima : ce point reflète donc avec plus de précision l'activité hémolytique d'un complément que le point 100 0/0. D'autre part, la détermination de l'unité 50 0/0 se fait comme nous le verrons dans la suite, non plus à l'œil nu, mais photométriquement, ce qui augmente la sensibilité de la mesure. C'est pourquoi Wadsworth et les Maltaner [11], et après eux de nombreux auteurs américains, mirent au point et utilisent des techniques de titrage du complément à 50 0/0 d'hémolyse.

Nous allons donc étudier en détail la réaction d'hémolyse à 50 0/0 et décrire une technique de titrage.

La réaction d'hémolyse à 50 0/0 est caractérisée par une grande sensi-

bilité et nombreux sont les facteurs qui influent sur la réaction. Pour que le titrage soit réellement précis il faut opérer dans des conditions techniques rigoureusement *standardisées* : ainsi la valeur de l'unité 50 o/o dépendra uniquement de l'activité hémolytique du complément.

En premier lieu, il est capital d'employer toujours dans la réaction la même quantité de globules rouges de mouton : nous parlerons donc tout d'abord de la standardisation de la suspension globulaire, standardisation qui se fait photométriquement avec une grande précision.

Après avoir étudié la technique du titrage du K, la courbe d'hémolyse et le calcul de l'unité 50 o/o, nous verrons l'influence qu'ont sur l'hémolyse les différents facteurs entrant en jeu dans la réaction. A ce point de vue, nous étudierons :

— tout d'abord l'influence des hémolysines, ce qui nous amènera à décrire le titrage du sérum hémolytique ;

— et enfin les différentes conditions physiques et chimiques dans lesquelles la réaction d'hémolyse est pratiquée. De cette étude nous déduirons la technique standard donnant à la réaction d'hémolyse sa sensibilité maxima sans nuire à l'exactitude des résultats qui ne doivent dépendre que de l'activité hémolytique du complément lui-même.

CHAPITRE PREMIER

PRÉPARATION ET STANDARDISATION PHOTOMÉTRIQUE DE LA SUSPENSION DE GLOBULES ROUGES DE MOUTON

I. — PRINCIPE DE LA STANDARDISATION PHOTOMÉTRIQUE

L'unité 50 o/o de complément est définie par rapport à une quantité fixe de globules rouges de mouton qui est introduite dans la réaction sous la forme d'un volume fixe de suspension globulaire diluée de titre exactement déterminé. On obtient une suspension du titre voulu en diluant en proportions convenables dans l'eau à 8,5 o/oo de ClNa (eau physiologique) le culot globulaire du sang de mouton lavé à trois reprises par centrifugation. Mais la teneur en hématies du culot globulaire n'est pas constante. Il est nécessaire de contrôler le titre de cette suspension et de l'ajuster ensuite au titre standard.

Ce contrôle peut se faire en comptant les globules de la suspension à l'hématimètre. Mais il est plus simple, comme l'indique Kent (12), de mesurer photométriquement la teneur en hémoglobine de cette suspension. Pour

cela l'hémoglobine contenue dans les globules est libérée en ajoutant à un volume connu de suspension globulaire un volume d'eau distillée suffisant pour lyser tous les globules. La densité optique de cette solution d'hémoglobine est mesurée grâce à un photomètre à cellule photo-électrique éclairé par un faisceau de lumière verte monochromatique. Dans cette solution, l'hémoglobine est sous forme d'oxyhémoglobine et l'absorption de lumière est maxima lorsque la lumière utilisée a une longueur d'onde de 5.410 Å ou de 5.760 Å. La plupart des auteurs font les mesures avec une lumière de $\lambda = 5.500$ Å.

Mais l'oxyhémoglobine en solution est progressivement transformée, par oxydation, en méthémoglobine de couleur brune, qui, à la longueur d'onde de 5.500 Å, absorbe moins de lumière que l'oxyhémoglobine rouge. D'où une erreur par défaut d'autant plus importante que la transformation en méthémoglobine est plus avancée mais qui ne dépasse jamais 2 ou 3 o/o. Pour remédier à cet inconvénient, il est recommandé d'effectuer les mesures avec une lumière de $\lambda = 5.410$ Å (ou même de 5.200 Å), longueurs d'onde où le défaut d'absorption de lumière de la méthémoglobine est moindre qu'à 5.500 ou 5.760 Å. Mais pour cela il faut utiliser un spectro-photo-colorimètre à réseau fournissant une lumière strictement monochromatique et de la longueur d'onde voulue.

2. — PRÉPARATION DES GLOBULES ROUGES DE MOUTON

Le sang de mouton est prélevé aseptiquement, avec les précautions habituelles, par ponction à la jugulaire. Le mouton doit être en bonne santé et ne doit pas être soumis à des saignées fréquentes. Le sang est recueilli dans un flacon stérile contenant 1 volume d'une solution stérile de citrate de sodium à 10 o/o pour 9 volumes de sang à prélever. Le flacon doit être soigneusement agité pendant la prise de sang. Il vaut mieux recueillir le sang sur anticoagulant que de le défibriner par agitation avec des billes de verre, ce qui entraîne une certaine altération des globules. Le sang citraté conservé stérile à la glacière et sans antiseptique est utilisable pendant au moins 15 jours ou 3 semaines.

Avant d'être employés dans la réaction d'hémolyse, les globules doivent être soigneusement lavés à l'eau physiologique pour les débarrasser de toutes traces de plasma et surtout de citrate de sodium qui possède la propriété de bloquer l'hémolyse par le complément. Les globules sont séparés du plasma par une première centrifugation. Le culot est repris par de l'eau à 8,5 o/oo de ClNa ; les globules sont remis en suspension et centrifugés à nouveau. Il faut faire trois lavages. Les globules en culot devront être

utilisés dans la journée, car ils se conservent mal même s'ils sont encore stériles. En effet, les hématies conservées en milieu isotonique, mais privées de protéines sériques sont plus fragiles que les hématies conservées dans leur plasma. C'est pourquoi Mayer [21] ajoute à la solution servant à préparer la suspension globulaire 0,1 o/o d'albumine de bœuf cristallisée. La lyse spontanée des globules est ainsi ralentie.

Si l'eau du troisième lavage est colorée, les globules ne doivent pas être utilisés.

3. — PRÉPARATION DE LA SUSPENSION D'HÉMATIES STANDARDISÉE

Nous avons utilisé pour effectuer toutes nos mesures le photo-colorimètre absolu de Bonét-Maury avec l'écran vert n° 3 ($\lambda = 5.200-5.700 \text{ \AA}$) et la cuve de verre à section carrée de 1 cm. de côté. L'échelle micrométrique de ce photo-colorimètre est graduée de 0 à 100 (les nombres du micromètre expriment des centièmes d'unité optique).

La suspension standard d'hématies de mouton est définie de la façon suivante : 0,50 cm³ de suspension globulaire + 5,5 cm³ d'eau distillée donnent une solution d'hémoglobine dont la densité optique est de 50 centièmes d'unité optique. Une telle suspension contient environ 800 millions d'hématies par centimètre cube.

La standardisation photométrique de la suspension globulaire se fait de la manière suivante : nous préparons une suspension de globules rouges de mouton en ajoutant 4 parties de culot globulaire à 96 parties d'eau physiologique. Cette suspension à 4 o/o doit être au moins aussi concentrée que la suspension standard. Nous lysons 0,50 cm³ de cette suspension par 5,5 cm³ d'eau distillée : soit d la densité optique de la solution ainsi obtenue (d doit être égal ou supérieur à 50). Pour obtenir la suspension globulaire standardisée il suffit d'ajouter $(d - 50) \text{ cm}^3$ d'eau physiologique à 50 cm³ de suspension d'hématies de mouton à 4 o/o.

CHAPITRE II

TITRAGE DU COMPLÉMENT A 50 0/0 D'HEMOLYSE.

LA COURBE D'HEMOLYSE.

Le titrage du complément à 50 o/o d'hémolyse consiste à faire agir pendant 1 heure à 37° des volumes croissants de complément sur un volume fixe d'une suspension d'hématies de mouton sensibilisées et à

déterminer ainsi le volume de complément capable d'hémolyser exactement 50 o/o des globules rouges. Le complément, même conservé dans de bonnes conditions étant très instable, *ce titrage doit se faire chaque jour.*

I. — TECHNIQUE DU TITRAGE

a) MATÉRIEL UTILISÉ. — Pour toutes nos expériences nous utilisons le matériel suivant :

— Les réactions sont faites dans des tubes à hémolyse de 12×75 mm. (tubes de Kahn pouvant être centrifugés).

— La préparation des réactifs titrés est faite à l'aide de pipettes précises de 1 cm^3 au $1/100^\circ$ et de 10 cm^3 au $1/10^\circ$.

— Pour la distribution des réactifs dans les tubes nous utilisons :

a) pour des volumes compris entre $0,05$ et $0,50 \text{ cm}^3$ et variant par fraction de $0,05 \text{ cm}^3$ des pipettes calibrées donnant exactement 20 gouttes au centimètre cube (pipettes de Duclaux), ce qui permet une distribution rapide et suffisamment précise ;

b) pour des volumes de 1 ou de $1,5 \text{ cm}^3$ des rhéomètres de Vernes convenablement réglés : distribution précise et qui assure un mélange parfait des réactifs.

Cette verrerie doit toujours être maintenue chimiquement propre. L'emploi du savon ou des lessives est à proscrire pour le nettoyage des tubes. En plus de cette verrerie nous utilisons un réfrigérateur, un bain-marie à 37° , une centrifugeuse et un photocolorimètre de Bonét-Maury.

b) RÉACTIFS. — 1. *Solution de ClNa chimiquement pur, à 8,5 0/00.* — Cette solution, isotonique (eau physiologique) sert à préparer toutes les dilutions des réactifs :

— l'eau doit être récemment distillée et son pH compris entre 7 et 7,3 ;

— le titre de 8,5 0/00 en ClNa doit être soigneusement respecté ;

— la solution doit être filtrée (et stérilisée si on veut la conserver plusieurs jours).

2. *Le complément.* — Les précautions habituelles doivent être prises pour assurer la meilleure qualité possible de ce réactif. On utilise donc un mélange du sérum de plusieurs cobayes robustes, et mâles de préférence. Les animaux à jeun sont saignés par section des carotides, ce qui est préférable à la ponction cardiaque, les cobayes soumis à des ponctions répétées fournissant à la longue un complément de mauvaise qualité. Le sang recueilli dans des tubes à centrifuger est abandonné 1 heure à la température du laboratoire. On décolle le caillot des parois de verre et on porte

les tubes dans le réfrigérateur pendant encore 1 ou 2 heures. On centrifuge et on recueille le sérum clair.

Le problème de la conservation du complément peut être résolu par une de ces quatre méthodes qui donnent toutes de bons résultats :

1. Lyophilisation (Flosdorf et Mudd) c'est-à-dire déshydratation sous vide à partir de l'état congelé. Le complément se trouve alors sous forme pulvérulente, en ampoules scellées et peut être conservé plusieurs mois même à la température ordinaire.

2. Conservation à l'état congelé (à -15° , -20°) ; on ne doit décongeler que la quantité de complément dont on a immédiatement besoin. La durée de conservation est de quelques semaines.

3. Dissoudre 1 g. de ClNa pur dans 10 cm³ de sérum de cobaye : le complément se conserve ainsi à la glacière durant 2 à 3 semaines.

4. Formule de Sonnenschein :

Acétate de sodium.....	10 g
Acide borique	4 g
Eau distillée	100 cm ³

ajouter une partie de complément à une partie de cette solution.

Le complément se trouve donc déjà dilué au 1/2. Mis à la glacière, il conserve ses propriétés durant 1 à 2 mois.

3. *Les globules rouges de mouton sensibilisés par l'hémolysine anti-mouton.* — Il est capital d'employer une dose d'hémolysines convenable. Cette dose est déterminée par un titrage dont nous parlerons au chapitre suivant. Dans toutes les réactions, nous utilisons une suspension d'hématies de mouton sensibilisées préparée en mélangeant 10 minutes avant l'emploi :

1 volume de suspension globulaire standardisée ;

1 volume de sérum hémolytique anti-mouton dilué au titre voulu ;

1 volume d'une solution à 1 0/00 dans l'eau physiologique de SO₄Mg, 7OH₂ (L'ion magnésium, en quantité convenable, favorise l'hémolyse comme nous le verrons par la suite ; 1 cm³ de cette solution contient environ 100 γ d'ions Mg).

c) *Mode opératoire.* — On dispose sur un portoir métallique une série de 11 tubes à hémolyse. Dans chacun de ces tubes, on ajoute dans l'ordre :

— le complément dilué au 1/100^e (la dilution ne doit être faite que quelques instants avant la distribution) : 0,05 cm³ dans le premier tube, 0,10 cm³ dans le deuxième, etc... (le onzième tube ne reçoit pas de complément : c'est un tube témoin qui ne contiendra que des globules rouges sensibilisés ; il ne doit présenter aucune trace d'hémolyse si les hématies sont de bonne qualité) ;

— de l'eau physiologique afin de compléter le volume de chaque tube à $1,5 \text{ cm}^3$;

— $1,5 \text{ cm}^3$ de la suspension de globules rouges de mouton sensibilisés dont nous avons parlé.

Le détail de cette distribution est indiqué dans le tableau 1.

Le portoir est alors placé dans le bain-marie à 37° . Il faut prendre la précaution d'agiter fréquemment les tubes pour éviter la sédimentation des globules, ce qui fausse les résultats du titrage en ne permettant pas une action régulière du complément.

Au bout de 45 minutes on retire les tubes du bain-marie. On constate que l'hémolyse est nulle ou partielle dans les premiers tubes, totale ou presque totale dans les derniers tubes.

Pour évaluer le pourcentage exact d'hémolyse dans chacun des tubes on opère de la façon suivante : les tubes sont centrifugés et on mesure la densité optique des solutions d'hémoglobine ainsi obtenues (Toujours en utilisant le photolorimètre de Bonét-Maury, écran vert n° 3, $\lambda = 5.200\text{--}5.700 \text{ Å}$).

Le rapport entre la densité optique du liquide contenu dans un tube présentant une hémolyse partielle et celle du liquide contenu dans un tube où l'hémolyse est totale exprime le pourcentage d'hémolyse dans le tube où l'hémolyse est partielle (Remarque).

Dans le tableau 2 nous mentionnons les résultats obtenus en effectuant le titrage d'un complément d'après cette technique.

REMARQUE. — On peut se dispenser de faire ce calcul, le chiffre lu sur le micro-mètre projeté du photolorimètre de Bonét-Maury représentant directement le pourcentage d'hémolyse. En effet, nous effectuons les mesures photométriques en utilisant la « méthode à charge constante » décrite par le constructeur de cet appareil (Établissements Jouan, Paris), mais en effectuant l'équilibrage de la cellule de compensation non pas en éliminant la cuve, mais en interposant sur le trajet du faisceau lumineux la cuve remplie d'eau distillée. De cette façon, le chiffre lu exprime directement la densité optique de la solution d'hémoglobine sans qu'il soit nécessaire de la corriger en y retranchant la densité optique de la cuve remplie d'eau distillée. D'autre part, la standardisation de la suspension globulaire est faite de telle manière que $0,50 \text{ cm}^3$ de suspension globulaire lysés totalement par $5,5 \text{ cm}^3$ d'eau distillée (volume total de 6 cm^3) fournissent une solution d'hémoglobine de densité optique 50; chaque tube de la réaction contient un volume total de 3 cm^3 dont $0,50 \text{ cm}^3$ de suspension globulaire standardisée; dans ces conditions, on peut conclure qu'il y a 50 o/o d'hémolyse dans le tube de la réaction contenant une solution d'hémoglobine de densité optique 50; le photolorimètre absolu de Bonét-Maury donnant une relation à peu près linéaire entre le titre des solutions d'hémoglobine et leur densité optique, il en résulte que la densité optique lue dans les conditions que nous venons de décrire représente directement et avec une approximation suffisante le pourcentage d'hémolyse atteint dans le tube de la réaction.

TABLEAU 1

Titrage du complément à 50 0/0 d'hémolyse.

Numéro des tubes. . . .	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Complément au 1/100 . .	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	0,45	0,50	—
Eau salée à 0,85 o/o. . .	1,45	1,40	1,35	1,30	1,25	1,20	1,15	1,10	1,05	1	1,50
G. R. sensibilisés (standardisés)	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50
45' à 37°. Centrifugation. Lecture photométrique du pourcentage d'hémolyse.											

TABLEAU 2

Résultats d'un titrage de complément à 50 0/0 d'hémolyse.

Numéro des tubes .	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Complément au 1/100	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	0,45	0,50	—
o/o d'hémolyse . .	0	5	19	40	60	77	90	98	100	100	0

d) *Tracé de la courbe d'hémolyse et détermination graphique de l'unité 50 0/0.* — Sur un papier millimétré nous traçons des axes de coordonnées et portons en abscisse les volumes de complément au 1/100° contenus dans chacun des 10 tubes du titrage et en ordonnée les pourcentages d'hémolyse correspondant. La valeur de l'unité 50 o/o est calculée par extrapolation graphique. On trace la courbe reliant ces points entre eux ; cette courbe en forme de S (courbe de Gauss) est appelée *courbe d'hémolyse* (fig. 1 correspondant aux chiffres mentionnés dans le tableau 2). L'abscisse du point de cette courbe d'ordonnée 50 (point d'inflexion) représente le volume de complément au 1/100° capable d'hémolyser 50 o/o des globules rouges de mouton employés : c'est l'unité 50 0/0 (de même, l'unité 100 o/o est l'abscisse du point d'ordonnée 100. Dans l'exemple choisi : unité 50 o/o = 0,225 de complément au 1/100° et unité 100 o/o = 0,425 de com-

plément au $1/100^{\circ}$). Par titre d'un complément on entend souvent le nombre d'unités 50 o/o contenu dans 1 cm^3 de sérum frais : ainsi le complément dont l'unité 50 o/o = $0,225 \text{ cm}^3$ au $1/100^{\circ}$ titre 445 unités au centimètre cube.

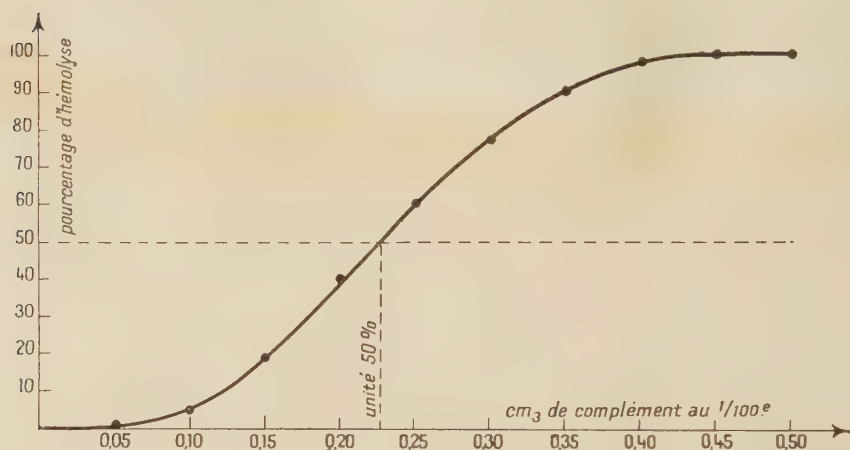


FIG. 1. — Courbe d'hémolyse permettant le calcul de l'unité 50 o/o (cf. Tableau 2).

2. — ÉTUDE DE LA COURBE D'HÉMOLYSE

a) INTERPRÉTATION DE LA COURBE D'HÉMOLYSE. AVANTAGES DE L'UNITÉ 50 o/o SUR L'UNITÉ 100 o/o.

Les courbes de Gauss sont rencontrées fréquemment lorsque l'on étudie des phénomènes d'ordre biologique portant sur une population formée d'individus qui ne sont pas tous exactement semblables. Dans le cas particulier de l'hémolyse, la forme de cette courbe indique que le nombre de globules rouges lysés n'est pas directement proportionnel au volume de complément utilisé : en effet, on remarque qu'il faut atteindre une certaine concentration en complément pour que la réaction commence. Ce seuil dépassé, ce sont les globules sensibilisés les plus fragiles qui sont hémolysés les premiers, puis les globules de résistance moyenne et enfin les globules les plus résistants qui exigent pour être détruits une concentration relativement élevée en complément. Ce phénomène indique que la masse des globules rouges sensibilisés est composée d'individus réagissant différemment à l'action lytique du complément. Cette hétérogénéité peut s'expliquer de deux façons : ou bien les hématies sont essentiellement de résistances différentes, ou bien (Morris) [13] la sensibilisation des hématies

par les molécules d'hémolysines s'est faite d'une manière hétérogène (peut-être parce que les hématies étaient déjà différentes les unes des autres).

De toute façon, il est préférable de titrer un complément d'après son action sur les globules de valeur moyenne (titrage à 50 o/o d'hémolyse) plutôt que d'après son action sur les hématies les plus résistantes qui constituent une minorité sujette à plus de variations suivant l'âge, la provenance et le mode de sensibilisation des globules (titrage à 100 o/o d'hémolyse). On se met ainsi à l'abri, dans une certaine mesure, des variations observées dans la résistance de globules de provenances différentes. L'unité 50 o/o est donc plus indépendante de la qualité des globules que l'unité 100 o/o.

D'autre part on observe sur la courbe d'hémolyse que l'unité 50 o/o étant située au point d'inflexion de la courbe reflète avec plus de sensibilité et de fidélité le pouvoir hémolytique d'un complément que l'unité 100 o/o. En effet, dans la partie moyenne de la courbe (zone d'hémolyse partielle) on voit qu'une petite variation de la concentration en complément produit une variation du pourcentage d'hémolysé relativement importante et facilement mesurable grâce au photomètre. A l'opposé dans la partie haute de la courbe (zone d'hémolyse presque totale) une même variation de la concentration en complément, engendre une variation du pourcentage d'hémolyse beaucoup plus faible et donc beaucoup plus difficile à apprécier. L'unité 50 o/o est donc un chiffre beaucoup plus précis que l'unité 100 o/o.

b) ÉQUATION DE COURBE D'HÉMOLYSE. CALCUL MATHÉMATIQUE DE L'UNITÉ 50 o/o. — Il y a deux moyens de calculer la valeur de l'unité 50 o/o : soit par la méthode graphique en se servant du tracé de la courbe d'hémolyse, soit indirectement en résolvant l'équation de la courbe.

La portion moyenne de la courbe comprise entre 30 et 70 o/o d'hémolyse est pratiquement une droite. Il est facile, comme nous venons de le voir, de calculer par extrapolation graphique la valeur de l'unité 50 o/o en connaissant seulement deux points de la courbe compris entre 30 et 70 o/o d'hémolyse.

L'équation de la courbe d'hémolyse pour un complément déterminé a été établie par von Krogh [9] :

$$x = K \left(\frac{y}{1-y} \right)^{1/n}$$

équation dans laquelle :

x = quantité de complément (en cm^3 de complément dilué ou pur) ;

y = indice d'hémolyse, c'est-à-dire $\frac{\text{pourcentage d'hémolyse}}{100}$;

K = constante exprimant la valeur de l'unité 50 0/0 (en cm^3 de complément dilué ou pur) ; en effet, pour $y=0,5$: $x=K$.

$1/n$ = constante déterminant la pente de la courbe ; d'après Wadsworth, $1/n = 0,2 \pm 0,02$ si la réaction est faite à 37° sans incubation préalable et avec des globules sensibilisés par une dilution de sérum hémolytique titrant 4 unités hémolytiques par centimètre cube [11]. Kent [14] a montré que $1/n$, donc l'inclinaison de la courbe, varie dans de larges mesures suivant le mode opératoire utilisé, la qualité du complément employé et aussi suivant la quantité d'hémolysine utilisée pour sensibiliser les globules.

Grâce à cette équation on peut calculer K (c'est-à-dire l'unité 50 o/o) en connaissant une seule valeur de x et la valeur de y correspondante (c'est-à-dire un seul point de la courbe d'hémolyse). Pour éviter des calculs compliqués, Wadsworth, Maltaner, Thompson [11-15] ont établi de la manière suivante des facteurs de conversion d'un emploi très simple : supposant $1/n$ fixe et égal à 0,2 et en posant $K=1$, l'équation devient :

$$x = \left(\frac{y}{1-y} \right)^{0,2}$$

Grâce à cette équation simplifiée, ces auteurs calculèrent les valeurs de x correspondant à différentes valeurs de y comprises entre 0,10 et 0,90. Pour calculer l'unité 50 o/o, il suffit de diviser par x (facteur de conversion) le volume de complément contenu dans un tube où le pourcentage d'hémolyse a été mesuré et est compris entre 10 et 90 o/o.

Kent, Bukantz et Rein [12] utilisent la formule de von Krogh sous sa forme logarithmique. L'équation devient :

$$\log x = \log K + 1/n \log \left(\frac{y}{1-y} \right).$$

Ils ont d'autre part calculé la valeur de $1/n$ pour différentes conditions d'expérience. Ils peuvent ainsi résoudre l'équation sous sa forme logarithmique, ce qui leur permet de tracer un graphique (à coordonnées arithmétiques) donnent directement la valeur de l'unité 50 o/o connaissant une seule valeur du pourcentage d'hémolyse compris entre 20 et 80.

La courbe représentative de l'équation de von Krogh sous sa forme logarithmique est une droite de pente $1/n$ et d'ordonnée à l'origine $\log K$ qui peut servir à la détermination graphique de l'unité 50 o/o (Heidelberger et Mayer) [16].

Dans notre travail nous déterminons simplement l'unité 50 o/o en traçant la courbe d'hémolyse sur un papier millimétré. Ceci nous a paru préférable pour les raisons suivantes :

— Le calcul de l'unité 50 o/o est ainsi rendu indépendant de la valeur de $1/n$ que les différents auteurs s'accordent à trouver variable dans de larges mesures, sans que l'on puisse toujours prévoir et mesurer ces variations.

— Si le tracé de la courbe est entaché d'une relative imprécision, cet inconvénient est compensé par le fait que plusieurs points sont nécessaires pour établir cette courbe : ainsi le résultat est plus indépendant des erreurs techniques que le résultat basé sur un seul point de la courbe.

CHAPITRE III

TITRAGE DU SÉRUM HÉMOLYTIQUE

La quantité d'hémolysines employées pour sensibiliser les globules rouges de mouton a une grande influence sur le résultat du titrage du complément. Le tableau suivant emprunté à Morris [13] montre les variations de la valeur de l'unité 50 o/o et celles de la pente de la courbe d'hémolyse (valeur de $1/n$) en fonction de l'augmentation du volume de sérum hémolytique (cf. tableau 3). Ce tableau illustre la « loi de suppléance » entre le sérum

TABLEAU 3 (d'après MORRIS) [13]

Variations de l'activité hémolytique d'un complément et de la pente de la courbe d'hémolyse (coefficient $1/n$) en fonction de la dose d'hémolysines employée pour sensibiliser les hématies de mouton.

Cm ³ de sérum hémolytique au 1/1000	0,05	0,075	0,10	0,15	0,20	0,30	0,40	0,60	0,80
Valeur de l'unité 50 o/o (en cm ³ de complément au 1/100).	2,95	0,80	0,58	0,46	0,42	0,38	0,36	0,35	0,34
Valeur du coefficient $1/n$ de la formule de von Krogh .	0,366	0,354	0,254	0,221	0,199	0,175	0,166	0,180	0,189

hémolytique et le complément dont nous allons parler. Il montre l'intérêt qu'il y a à employer une grande quantité d'hémolysines pour que la valeur de l'unité 50 o/o soit la plus faible possible, donc pour que la réaction d'hémolyse ait sa sensibilité maxima, et aussi pour que la pente

de la courbe d'hémolyse soit sujette à moins de variations que si le sérum hémolytique était employé à dose moindre : cette dose forte doit être déterminée par un titrage.

I. — LOI DE SUPPLÉANCE. TITRE ET QUALITÉ DU SÉRUM HÉMOLYTIQUE

Les principes du titrage du sérum hémolytique sont bien connus depuis les études de différents auteurs (Ronchèse, Eagle) [17], etc... Le résultat de ces études est résumé par la *loi de suppléance* dont voici l'énoncé : pour provoquer l'hémolyse d'une dose fixe de globules rouges on peut, entre *certaines limites*, suppléer à un défaut d'hémolysines par un excès de complément et inversement suppléer à un défaut de complément par un excès d'hémolysines. Les *limites* entre lesquelles cette loi s'applique sont (dans des conditions de temps, de température, et de concentration strictement déterminées) :

— d'une part, une quantité minima d'hémolysines en dessous de laquelle le pourcentage de globules hémolysés sera nul, quel que soit l'excès de complément employé. Cette *dose minima active d'hémolysines* est celle déterminée dans le titrage classique du sérum hémolytique et est appelée « unité hémolytique » ;

— d'autre part, une quantité minima de complément : si l'on emploie moins de complément, le pourcentage d'hémolyse tendra à devenir nul, quel que soit l'excès d'hémolysines employé. A cette *dose minima active de complément* qui représente l'unité de complément lorsque le titrage est fait en présence d'un gros excès d'hémolysines, correspond une dose d'hémolysines que nous appellerons *dose optima*.

Ces différentes notions apparaissent clairement sur le graphique ci-contre (cf. fig. 2). Chaque courbe exprime les variations de volume de sérum hémolytique nécessaire pour obtenir l'hémolyse d'une dose fixe de globules rouges si on fait varier le volume de complément utilisé et est une hyperbole équilatère : les coordonnées des deux asymptotes représentent les limites entre lesquelles joue la loi de suppléance.

— L'abscisse de l'asymptote parallèle à l'axe des ordonnées représente la « *dose minima active d'hémolysines* » ou « titre classique de l'hémolysine ».

— L'ordonnée de l'asymptote parallèle à l'axe des abscisses est la « *dose minima active de complément* », et l'abscisse du point où la courbe devient pratiquement tangente à cette asymptote est la « *dose optima* » d'hémolysines.

Le tracé complet de cette courbe est essentiellement variable suivant le sérum hémolytique utilisé et est caractéristique de ce sérum. Laporte et Hardre de Looze [18] ont montré que la « dose minima active » d'hémolysines n'est pas le seul facteur à considérer dans l'étude d'un sérum hémolytique : en effet, d'après les courbes publiées par ces auteurs (cf. fig. 2) on voit que les sérums hémolytiques diffèrent entre eux non seulement par leur titre classique, mais aussi par la valeur de la dose

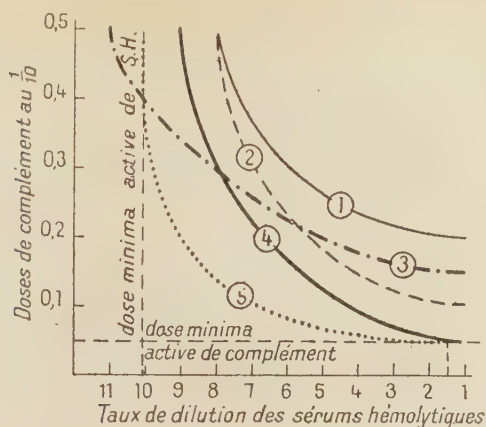


FIG. 2. — Courbes de la loi de suppléance (d'après LAPORTE et HARDRE DE LOOZE [18]).

Chacune des courbes représente la loi de suppléance pour un sérum hémolytique déterminé (numéroté de 1 à 5).

En ordonnée : les doses en centimètres cubes de complément au 1/10.

En abscisse : les taux de dilution du sérum hémolytique. Ces dilutions croissent en progression géométrique, de droite à gauche ; le joint 1 correspond à une dilution au 1/4, le joint 2 à une dilution au 1/8, ... le joint 11 à une dilution au 1/4.096.

minima active de complément qui dépend de la *qualité* de ces hémolysines : à un sérum de bonne qualité correspond une dose minima active de complément plus faible que la dose minima active correspondant à un sérum de qualité inférieure. La qualité des hémolysines est entièrement indépendante de la valeur de la dose minima active d'hémolysines. Il faut donc mesurer à la fois la dose minima active de sérum hémolytique et la dose minima active de complément, pour connaître la valeur réelle d'un sérum hémolytique.

2. — PRINCIPE DU TITRAGE DU SÉRUM HÉMOLYTIQUE EN VUE DE SON UTILISATION
DANS LA RÉACTION D'HÉMOLYSE

Il est évident, en voyant la courbe de la loi de suppléance, que pour réaliser le titrage du complément dans les meilleures conditions possibles, on doit opérer en dehors des limites de la loi de suppléance, c'est-à-dire utiliser un volume de sérum hémolytique nettement supérieur à la dose optima (la dose double par exemple). Cette dose permet de mesurer lorsque l'on fait le titrage du complément, la *dose minima active* de complément correspondant au sérum hémolytique utilisé ce qui donne à la réaction d'hémolyse sa sensibilité maxima, tout en ménageant une marge de sécurité suffisante ; en effet, l'excès de sérum hémolytique est tel qu'une faible variation de la dose d'hémolysines employée ne suffit pas pour rentrer de nouveau dans les limites où la loi de suppléance s'applique et l'unité de complément ne variera pas.

Titrer le sérum hémolytique revient donc pratiquement à calculer la dose optima d'hémolysines et la seule manière logique de le faire est de déterminer cette dose optima en présence de la dose minima active de complément qui dépend de la qualité des hémolysines. La recherche de cette dose minima active doit donc précéder la recherche de la dose optima de sérum hémolytique. Le titre trouvé est alors une caractéristique du sérum étudié puisqu'il tient compte de la qualité des hémolysines et est indépendant du titre du complément (en effet, recherchée avec des compléments de titres différents, la dose optima d'hémolysines est toujours la même pour un même sérum). Nous allons exposer une technique de titrage s'inspirant de ce principe.

3. — TECHNIQUE DU TITRAGE DU SÉRUM HÉMOLYTIQUE
EN VUE DE LA RÉACTION A 50 0/0 D'HÉMOLYSE

Pour titrer le sérum hémolytique nous employons une méthode analogue à celle décrite par Kent [19]. Le titrage se fait en deux temps :

— On recherche d'abord la *dose minima active de complément* correspondant au sérum hémolytique étudié, c'est-à-dire que l'on calcule l'unité 50 0/0 d'un complément quelconque en présence d'un *très fort excès* du sérum hémolytique considéré.

— On recherche ensuite la *dose optima d'hémolysines* en présence de l'unité 50 0/0 ainsi calculée : cette dose optima est la dose la plus faible de sérum hémolytique permettant d'obtenir encore 50 0/0 d'hémolyse en présence de cette quantité fixe et connue de complément. Contrairement au titre du complément qui varie chaque jour, le titre du sérum hémoly-

lique est pratiquement invariable : il suffit de le vérifier tous les trois ou quatre mois.

a) MATÉRIEL ET RÉACTIFS. — Le *sérum hémolytique* est un sérum de lapin ou de cheval anti-hématics de mouton préparé suivant les méthodes classiques et conservé à la glacière en l'additionnant d'un égal volume de glycérine pure et neutralisée. Ce sérum ne doit pas agglutiner les globules rouges de mouton au taux où il est utilisé pour l'hémolyse. Les autres réactifs (suspension globulaire standardisée, complément) étant les mêmes que ceux servant au titrage du complément, toutes les indications les concernant ont déjà été données.

— Le matériel est le même que celui servant au titrage du complément.

b) MODE OPÉRATOIRE. — On prépare une solution mère au $1/200^{\circ}$ du sérum hémolytique étudié.

PREMIER TEMPS. — *Titrage de l'unité 50 0/0 du complément du jour en présence du sérum hémolytique au $1/200^{\circ}$.*

On titre l'unité 50 0/0 suivant la technique précédemment décrite (cf. tableau 1) mais les globules rouges de mouton sont sensibilisés en mélangeant 10 minutes avant l'emploi :

- 1 volume de suspension globulaire standardisée ;
- 1 volume de sérum hémolytique au $1/200^{\circ}$;
- 1 volume de solution isotonique de SO_4Mg à 1 0/00.

On distribue $1,5 \text{ cm}^3$ de ce mélange dans tous les tubes du titrage : donc chaque tube contient $0,50 \text{ cm}^3$ de sérum hémolytique au $1/200^{\circ}$.

DEUXIÈME TEMPS. — *Recherche de la dose optima d'hémolysines en présence d'une unité 50 0/0 du complément du jour.*

Dans une série de 10 tubes à hémolyse, on distribue dans l'ordre (voir tableau 4) :

— des doses croissantes de sérum hémolytique dilué au $1/200^{\circ}$: $0,05 \text{ cm}^3$ dans le premier tube, $0,10 \text{ cm}^3$ dans le deuxième, $0,15 \text{ cm}^3$ dans le troisième et ainsi de suite ;

— de l'eau physiologique pour compléter le volume de chaque tube à $0,50 \text{ cm}^3$;

— dans chaque tube 1 cm^3 du mélange contenant :

- 1 volume de suspension globulaire standardisée ;
- 1 volume de SO_4Mg à 1 0/00.

Chaque tube contient donc $0,50 \text{ cm}^3$ de suspension standardisée d'hématies.

On attend dix minutes pour permettre la sensibilisation des globules.

TABLEAU 4

Titrage du sérum hémolytique en vue de la réaction à 50 0/0 d'hémolyse.

Numéro des tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sérum hémolytique au 1/200	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	0,45	0,50
Eau salée à 8,5 0/0	0,45	0,40	0,35	0,30	0,25	0,20	0,15	0,10	0,05	—
G. R. standardisés (+ M_g^{++})	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
attendre 10'										
Complément dilué (1 unité 50 0/0 dans 1,5 cm ³)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
45' à 37°. Centrifugation. Lecture photométrique du pourcentage d'hémolyse.										

— On ajoute alors dans chaque tube 1,5 cm³ de complément dilué de telle manière que 1,5 cm³ de cette dilution contienne 1 unité 50 0/0 du complément titré dans le premier temps. Par exemple, si l'unité était 0,25 cm³ au 1/100°, le complément devra être dilué à $\frac{1}{\frac{100 \times 1,5}{0,25}} = 1/600^\circ$.

Les tubes sont placés dans le bain-marie à 37° pendant 45 minutes. On les agite fréquemment. Les tubes sont ensuite centrifugés et l'on évalue photométriquement le pourcentage d'hémolyse atteint dans chacun de ces tubes. A titre d'exemple les résultats obtenus avec un sérum de cheval sont rapportés dans le tableau 5.

TABLEAU 5

Résultats d'un titrage de sérum hémolytique.

Numéro des tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sérum hémolytique au 1/200	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	0,45	0,50
0/0 d'hémolyse	18	35	42	48	50	52	52	54	55	55

c) INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS ET CALCUL DU TITRE DU SÉRUM HÉMO-
 LYTIQUE. — On constate que le pourcentage d'hémolyse croît rapidement
 d'un tube à l'autre dans les premiers tubes du titrage, jusqu'au premier
 tube où l'hémolyse est voisine de 50 o/o. La dose de sérum hémolytique
 contenu dans le tube est la *dose optima* (soit 0,21 cm³ de sérum hémolytique
 au 1/200^e dans l'exemple choisi). Dans les tubes suivants le pourcentage
 d'hémolyse augmente encore d'un tube à l'autre, mais beaucoup plus len-
 tement (En effet, une augmentation de la dose d'hémolysines se traduit tou-
 jours par une légère augmentation du pourcentage d'hémolyse). On peut
 exprimer graphiquement ces résultats en traçant la courbe représentative
 des variations du pourcentage d'hémolyse en fonction de l'augmentation du

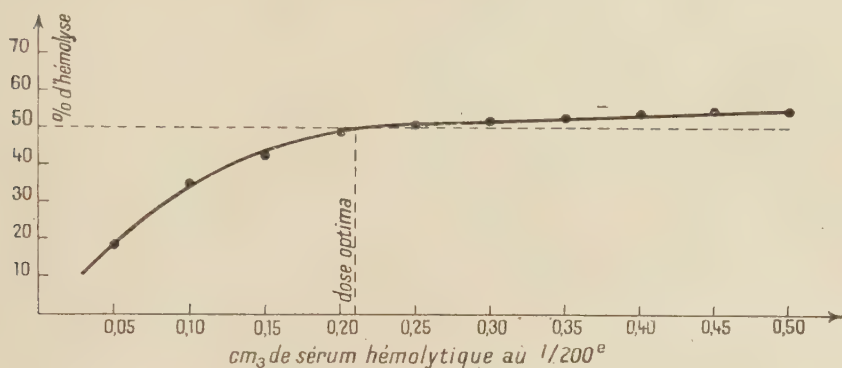


FIG. 3. — Courbe permettant le calcul de la dose optima de sérum hémolytique
 (cf. Tableau 5).

volume de sérum hémolytique au 1/200^e utilisé. Cette courbe, d'après
 Kent [20], est une hyperbole. L'abscisse du point où cette courbe devient
 pratiquement parallèle à l'axe des abscisses représente la dose optima
 d'hémolysines. La figure 3 représente la courbe tracée d'après les chiffres
 du tableau 5.

Si l'hémolyse n'atteint 50 o/o que dans le dernier tube du titrage c'est
 que la dose de 0,50 cm³ de sérum hémolytique au 1/200^e ne représente
 pas un excès suffisant d'hémolysine : ce sérum n'est pas assez actif et ne
 doit pas être utilisé.

Si au contraire l'hémolyse atteint 50 o/o dans tous les tubes sauf dans le
 premier, ou dans le premier et le deuxième, c'est que le sérum est très
 actif, dans ce cas pour calculer la dose optima avec plus de précision on
 doit recommencer le titrage en partant d'une dilution mère au 1/600^e.

En pratique nous utilisons dans la réaction d'hémolyse à 50 o/o non pas une, mais deux doses optima d'hémolysines, et sous le volume de 0,50 cm³ : de cette façon on a toujours un excès de sérum hémolytique représentant une marge de sécurité suffisante. Ainsi, pour le sérum étudié la dose optima étant de 0,21 cm³ de sérum hémolytique au 1/200°, nous utilisons dans les réactions ce sérum dilué à $\frac{1}{\frac{200 \times 0.50}{0.42}} = 1/240^\circ$.

En résumé : pour que l'unité 50 o/o de complément soit la plus petite possible, donnant ainsi à la réaction d'hémolyse sa sensibilité maxima et pour que la valeur de cette unité ne dépende que de l'activité du complément que l'on utilise, on doit toujours employer pour sensibiliser les hématies de mouton :

- un sérum hémolytique de bonne qualité ;
- un excès titré de ce sérum hémolytique.

CHAPITRE IV

ÉTUDE DE L'INFLUENCE DES DIFFÉRENTS FACTEURS PHYSIQUES ET CHIMIQUES SUR L'ACTIVITÉ HÉMOLYTIQUE DU COMPLÈMENT

L'activité hémolytique d'un complément dépend des conditions physiques et chimiques (temps, température, pH, etc...) dans lesquelles la mesure de cette activité a été faite. Différents auteurs et principalement Heidelberger, Mayer et leurs collaborateurs [21-22] ont particulièrement étudié l'influence de ces différents facteurs sur le titre du complément. Voici leurs conclusions qui nous ont permis d'établir un mode opératoire rationnel du titrage du complément.

1° *Temps d'hémolyse.* — Le pourcentage de globules rouges sensibilisés hémolysés à 37° par une dose fixe de complément varie en fonction du temps : ce pourcentage augmente rapidement et atteint son maximum en 45 minutes. On a donc intérêt pour rendre le titrage du complément indépendant du facteur temps à choisir un temps d'hémolyse supérieur ou égal à 45 minutes, ce qui permet en outre de donner à la réaction sa sensibilité maxima.

2° *Température d'hémolyse.* — Entre 37° et 34° l'activité hémolytique du complément ne varie pratiquement pas. Au contraire le titre du complément baisse si la température s'élève au-dessus de 37° ou descend en-dessous de 34°.

3° *Effet de la concentration saline.* — Entre certaines limites d'isotonicité le titre du complément (nombre d'unités 50 o/o par centimètre cube) est inversement proportionnel à la concentration en ClNa du milieu. Ces variations sont importantes et justifient le soin particulier que l'on doit apporter à la préparation de l'eau servant à diluer les différents réactifs.

4° *Effet du volume total contenu dans les tubes du titrage.* — La dose en valeur absolue de chacun des réactifs étant constante, le titre du complément est inversement proportionnel au volume total sous lequel la réaction est effectuée : si le titre est de 272 pour un volume de 2 cm^3 , il sera de 211 pour un volume de 3 cm^3 et de 148 pour 5 cm^3 (Heidelberger).

5° *Effet du pH.* — Entre pH 6,9 et 7,6 les variations observées dans l'activité hémolytique du complément sont minimales.

6° *Influence du magnésium.* — L'ion Mg^{++} , même à l'état de traces infinitésimales, est nécessaire pour que se manifeste l'action hémolytique du complément : les citrates et les pyrophosphates qui précipitent cet élément inhibent totalement l'hémolyse par le complément. Mais pour que cette activité hémolytique soit maxima il faut qu'il y ait dans le milieu une dose optima d'ions Mg^{++} .

Nous avons vérifié que la dose optima de Mg^{++} à ajouter dans les tubes du titrage du complément tel que nous l'effectuons est de 50 γ (0,50 cm^3 de SO_4Mg , 7OH₂ à 1 o/oo), ce qui permet de doubler le titre de certains compléments particulièrement pauvres en Mg^{++} . Les doses supérieures à 200 γ diminuent le pouvoir hémolytique et même la dose de 2.000 γ bloque l'hémolyse.

DEUXIÈME PARTIE

RÉACTION QUANTITATIVE DE FIXATION DU COMPLÉMENT

Les réactions quantitatives de fixation du complément sont de deux types :

1° La technique la plus simple est de préparer une série de dilution du sérum à étudier. On effectue alors une *réaction qualitative* avec chacune des dilutions utilisées sous le même volume que le sérum pur. *Le titre en anticorps du sérum est exprimé par le taux de dilution le plus élevé donnant encore une réaction positive.* Toutes les réactions qualitatives permettent d'obtenir des résultats quantitatifs en utilisant cette méthode de dilu-

tion du sérum. Le titre d'un sérum sera évidemment d'autant plus élevé que la réaction choisie sera plus sensible.

Les réactions quantitatives de Kolmer, Eagle, etc..., qui sont d'un usage courant dans la pratique du séro-diagnostic de la syphilis sont de ce type. De même la réaction de Friedewald [23] pour le séro-diagnostic de la grippe, mais qui se distingue par le fait que le complément est titré à 50 o/o d'hémolyse ce qui donne à cette réaction une très grande sensibilité. Toutes ces réactions sont faciles à exécuter, la mise au point en est simple puisque le complément et l'antigène sont utilisés à doses fixes, les mêmes que dans la réaction qualitative correspondante. La précision dépend surtout du soin apporté à la préparation des dilutions de sérum.

2° On peut aussi représenter le titre d'un sérum en anticorps par le nombre d'unités de complément fixées par un volume déterminé de ce sérum en présence de l'antigène correspondant (Remarque). C'est le principe de l'ancienne réaction de Calmette-Massol dans laquelle on fait réagir sur des volumes fixes de sérum et d'antigène des quantités croissantes de complément. Mais pour obtenir des résultats strictement quantitatifs dans les réactions de ce type il est nécessaire d'utiliser l'antigène à doses rigoureusement déterminées et, non pas fixes, mais croissantes.

En effet, la réaction de fixation du complément est comme toutes les réactions antigène-anticorps sensible au *phénomène de zone*, c'est-à-dire que la réaction peut être totalement ou partiellement inhibée soit par un excès d'anticorps, soit par un excès d'antigène. Or, il y a d'autant plus de complément fixé que le complexe antigène-anticorps est plus important. A une quantité donnée d'anticorps, correspond une quantité *optima* d'antigène déterminée par un titrage et l'on s'aperçoit que cette dose d'antigène croît à mesure qu'augmentent les doses correspondantes d'anticorps et de complément fixé. Donc, dans une réaction du type Calmette-Massol, il faut employer des *doses d'antigène croissant* dans le même sens que les doses de complément, si l'on veut opérer à l'optimum de la réaction antigène-anticorps et obtenir ainsi des résultats strictement quantitatifs ; ce qui n'est pas le cas dans la réaction de Calmette-Massol originale dans laquelle l'antigène est utilisé à la même dose dans tous les tubes. Nous reviendrons sur ces notions lorsque nous étudierons le titrage de l'antigène.

REMARQUE. — Heidelberger [24-25] emploie une méthode directe chimique pour doser le complément fixé sur un complexe antigène-anticorps. Il dose, d'une part, l'azote d'un précipité spécifique lavé, d'autre part, l'azote de ce même précipité lavé mais formé en présence de complément. L'augmentation du poids d'azote du précipité correspond au complément fixé. Cette méthode de recherche confirme que la quantité de complément fixé est directement proportionnelle à la richesse en anticorps d'un sérum, mais elle ne peut être employée dans la pratique courante.

Wadsworth et les Maltaner ont mis au point une technique basée sur ces principes et utilisant le complément titré à 50 o/o d'hémolyse ce qui augmente la sensibilité de la réaction et la précision des mesures [11, 26, 27, 28]. Ils l'ont appliquée au séro-diagnostic quantitatif de la tuberculose et à celui de la syphilis. Ils ont démontré qu'à condition d'opérer à l'optimum de la réaction antigène-anticorps, il existe une relation linéaire entre la quantité d'anticorps contenu dans un sérum et la quantité de complément fixé (mesurée en unités 50 o/o et qui exprime le titre du sérum). En effet, dans leur réaction, le titre en anticorps d'un sérum est représenté par le rapport :

$$\frac{\text{quantité de complément donnant 50 o/o d'hémolyse}}{\text{en présence de sérum et d'antigène}} \div \frac{\text{quantité de complément donnant 50 o/o d'hémolyse en présence de sérum seul}}$$

Rice a aussi obtenu une relation linéaire entre la dose de sérum et le complément fixé, en étudiant le système sérum antigonococcique-antigène gonococcique [29] et le système sérum antipneumococcique-polysaccharide du pneumocoque III [30] et en utilisant les doses d'antigène convenables.

La réaction quantitative de fixation du complément que nous allons décrire a le même principe que celle de Wadsworth (doses croissantes d'antigène et de complément mesuré en unités 50 o/o) mais elle en diffère par les points suivants :

— la technique de la réaction est adoptée à l'emploi du complément titré à 50 o/o d'hémolyse comme il a été exposé dans les chapitres précédents ;

— les principes et la technique du titrage de l'antigène sont effectués d'une manière originale dérivant directement de la technique de la réaction [56].

Cette réaction quantitative a été réalisée pour effectuer le dosage précis de la réagine des sérums syphilitiques en utilisant un antigène à la cardiolipine. Mais elle peut servir à l'étude d'autres systèmes antigène-anticorps.

Nous allons donc d'abord exposer la technique de la réaction quantitative puis la technique du titrage de l'antigène qui en dérive. La courbe du titrage de l'antigène montre l'intérêt qu'il y a à employer dans la réaction des doses croissantes d'antigène afin d'obtenir une relation linéaire entre le complément fixé et l'anticorps.

Enfin, nous étudierons les facteurs, autres que l'anticorps lui-même et le titre de l'antigène, pouvant faire varier la quantité de complément fixé ; étude d'où ressort le mode opératoire adopté pour la réaction.

CHAPITRE PREMIER

TITRAGE D'UN SÉRUM SYPHILITIQUE PAR UNE RÉACTION QUANTITATIVE DE FIXATION DU COMPLÉMENT

Les sérums syphilitiques contiennent une globuline spéciale de la classe des anticorps : la *réagine*, isolée par Neurath et ses collaborateurs [31]. Cette réagine forme un complexe spécifique avec un lipide appelé *cardiolipine*, isolé par Pangborn du cœur de bœuf [32-33]. Toutes les réactions de séro-diagnostic de la syphilis (réactions de floculation ou réactions d'hémolyse) sont basées sur ce principe.

La réaction quantitative entre la réagine du sérum syphilitique, l'antigène à la cardiolipine et le complément mesuré en unités 50 o/o s'effectue dans cinq tubes à hémolyse. Chaque tube contient la même quantité de sérum mais des doses croissantes et connues d'antigène et de complément. Après le temps nécessaire à la fixation, à basse température, d'une partie du complément sur le complexe réagine-cardiolipine, on ajoute à chacun des cinq tubes la même dose de globules rouges de mouton sensibilisés. On porte les tubes à 37° : le complément qui n'a pas été fixé hémolyse les hématies sensibilisées. On effectue donc dans ce deuxième temps un véritable titrage (à 50 o/o d'hémolyse) du complément résiduel. On en déduit le nombre d'unités 50 o/o de complément fixées dans le premier temps de la réaction : ce chiffre exprime le titre en réagine du sérum syphilitique.

I. — PRÉPARATION DES RÉACTIFS

— Le *sérum* soigneusement centrifugé est *inactivé* par chauffage dans un bain-marie à 55°-56° pendant exactement 30 minutes.

— Le *complément* est apporté par du sérum frais de cobaye *titré* à 50 0/0 d'hémolyse par la méthode précédemment décrite. On en prépare une dilution contenant 50 unités 50 0/0 dans 1 cm³ (soit 1/r le taux de cette dilution). Par exemple, si l'unité 50 o/o est 0,24 cm³ au 1/100°, le complément doit être dilué à
$$\frac{1}{\frac{100 \times 1}{50 \times 0,24}} = 1/8,35 \quad (1/r = 1/8,35).$$

— *Suspension d'antigène à la cardiolipine*. — Nous utilisons l'antigène à la cardiolipine préparé par le Service des Antigènes de l'Institut Pasteur pour les réactions de fixation du complément. Cet antigène semi-synthétique est une solution alcoolique contenant par centimètre cube : 0,06 mg. de cardiolipine, 0,05 mg. de lécithine et 0,9 mg. de cholestérol. La lécithine

thine et la cardiolipine sont purifiées suivant la technique décrite par M. Faure [57-58]. Lorsque l'on mélange cet antigène à de l'eau salée à 8,5 o/oo on obtient une suspension colloïdale de ces lipides antigéniques. On utilise dans tous les tubes de la réaction un même volume de suspension antigénique (1 cm³) mais le titre de la suspension varie pour chacun des cinq tubes de la réaction. Voici les titres correspondants calculés d'après les résultats du titrage de l'antigène que nous exposerons dans le chapitre suivant :

Titre I :	0,01 cm ³	d'antigène pur dans 31 cm ³	d'eau à 8,5 o/oo	de ClNa
Titre II :	0,03 cm ³	»	»	32 cm ³ » »
Titre III :	0,05 cm ³	»	»	32 cm ³ » »
Titre IV :	0,07 cm ³	»	»	32 cm ³ » »
Titre V :	0,09 cm ³	»	»	32 cm ³ » »

Les suspensions colloïdales d'antigène se préparent de la manière suivante :

On mesure dans 5 Béchers de 250 cm³ les volumes d'eau physiologique indiqués.

On prélève l'antigène avec une pipette donnant exactement 100 gouttes d'antigène pur par centimètre cube (Pipette Pasteur convenablement étirée et étalonnée). On laisse tomber le nombre de gouttes nécessaires dans l'eau physiologique contenue dans chacun des Béchers auxquels on imprime un léger mouvement de rotation.

Ces suspensions colloïdales doivent être distribuées entre la 10^e et la 30^e minute qui suivent leur préparation.

— Les globules rouges de mouton sensibilisés sont les mêmes que ceux employés dans le titrage du complément, c'est-à-dire que l'on utilise 1,5 cm³ du mélange, préparé 10 minutes avant l'emploi de :

- 1 volume de suspension globulaire standardisée;
- 1 volume de sérum hémolytique dilué au titre voulu;
- 1 volume d'une solution à 1 o/oo de SO₄Mg, 7OH₂ dans l'eau physiologique.

2. — MODE OPÉRATOIRE

a) *Distribution des réactifs.* — La réaction s'effectue dans 5 tubes. Un 6^e tube est le tube témoin du pouvoir anticomplémentaire possible du sérum. On distribue dans ce tube 0,05 cm³ de sérum inactivé, 0,05 cm³ de complément dilué à 1/r et 1,40 cm³ d'eau physiologique. Dans chacun des 5 tubes « réaction » on distribue dans l'ordre (voir tableau 6) :

— 0,05 cm³ de sérum inactivé dans chaque tube ;

— le complément dilué à 1/r (50 unités 50 o/o dans 1 cm³) en volumes croissant en progression arithmétique : 0,05 cm³ (soit 2,5 unités 50 o/o) dans le 1^{er} tube, puis, 0,15, 0,25, 0,35 et 0,45 cm³ dans les 2^e, 3^e, 4^e et

5° tubes, ce qui correspond respectivement à 7,5, 12,5, 17,5 et 22,5 unités 50 o/o de complément ;

— de l'eau physiologique pour compléter le volume à 0,50 cm³ (Toutes ces distributions se faisant à la pipette Duclaux).

— Les suspensions antigéniques sous le volume de 1 cm³ mesuré avec un rhéomètre réglé à 1 cm³; suspension de titre I dans le tube n° 1, suspension de titre II dans le tube n° 2, etc...

— On ajoute un 7° tube, témoin de la dilution du complément à 1/r : il contient 1,5 cm³ de complément dilué à 1/r × 75, ce qui équivaut à 1 unité 50 o/o.

TABLEAU 6

Réaction quantitative de fixation du complément
(titré à 50 o/o d'hémolyse).

	Tube T. S.	Numéro des tubes « réaction »				
		1	2	3	4	5
Sérum inactivé (pur ou dilué au 1/10)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Complément dilué à 1/r (50 unités 50 o/o dans 1 cm ³)	0,05	0,05	0,15	0,25	0,35	0,45
Eau salée à 0,85 o/o	1,40	0,40	0,30	0,20	0,10	—
Suspension antigénique titre I. .	—	1	—	—	—	—
» » » II .	—	—	1	—	—	—
» » » III .	—	—	—	1	—	—
» » » IV .	—	—	—	—	1	—
» » » V .	—	—	—	—	—	1
6 heures de fixation à 6-8° + 10' à 37°						
G. R. sensibilisés (standardisés) .	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
45' à 37°. Centrifugation. Lecture photométrique du pourcentage d'hémolyse.						

b) *Temps de fixation.* — La distribution terminée, tous les tubes sont immédiatement portés dans un réfrigérateur réglé à +6°, +8° et abandonnés pendant 6 heures.

c) *Temps d'hémolyse.* — Après 6 heures, les tubes sont portés 10 minutes au bain-marie à 37° . On ajoute alors dans chaque tube $1,5 \text{ cm}^3$ de la suspension de globules rouges de mouton sensibilisés et on remet les tubes dans le bain-marie à 37° pendant 45 minutes. Les tubes sont centrifugés et le pourcentage d'hémolyse atteint dans chaque tube est évalué au photocolorimètre de Bonét-Maury en utilisant l'acran vert n° 3 ($\lambda = 5.200 - 5.500 \text{ \AA}$), comme dans le titrage du complément.

3. — RÉSULTATS ET CALCUL DU TITRE DU SÉRUM

— Le tube témoin de la dilution du complément à $1/r$ contenant 1 unité 50 o/o (soit $0,02 \text{ cm}^3$ de complément à $1/r$ ou $1,5 \text{ cm}^3$ de complément à $1/r \times 75$) doit présenter environ 50 o/o d'hémolyse (entre 45 et 55 en tenant compte du fait que le coefficient d'erreur est de l'ordre de 10 o/o), sinon il faut recommencer la réaction en ayant soin de retirer le complément au préalable.

— Si le sérum ne contient pas de réagine syphilitique, le complément n'a pas été fixé et le pourcentage d'hémolyse est le même dans le premier tube réaction et dans le tube témoin-sérum. Les quatre autres tubes « réaction » sont parfaitement hémolysés.

— Si le sérum contient de la réagine, le complément a été fixé en quantité correspondante : on constate que les premiers tubes ne sont pas hémolysés alors que l'hémolyse est totale ou presque dans les derniers. En général, entre ces extrêmes un tube ou deux présentent une hémolyse partielle : l'ensemble de ces 5 tubes contenant des doses croissantes de complément réalise ainsi un véritable titrage du complément en présence de sérum et d'antigène et après un temps de fixation de 6 heures. On sait que la courbe représentative des variations du pourcentage d'hémolyse en fonction de l'augmentation du volume de complément employé est une courbe de Gauss, comme nous l'avons vu en parlant du titrage du complément à 50 o/o d'hémolyse. Sur un papier millimétré on porte, en abscisse, les volumes du complément à $1/r$ utilisés dans chacun des cinq tubes de la réaction et en ordonnée les pourcentages d'hémolyse correspondants. Les points ainsi construits peuvent être reliés graphiquement par une courbe en forme de S. L'abscisse du point de cette courbe d'ordonnée 50 représente le volume de complément à $1/r$ qui en présence de $0,05 \text{ cm}^3$ de sérum et de l'antigène à la dose optima, permet l'hémolyse de 50 o/o des globules rouges. Soit $x \text{ cm}^3$ ce volume, qui équivaut à $\frac{x}{0,02}$ unités 50 o/o de complément puisque 1 unité 50 o/o = $0,02 \text{ cm}^3$ de complément à $1/r$ (1 cm^3 de complément à $1/r = 50$ unités 50 o/o). Le nombre d'unités 50 o/o

fixées par 0,05 cm³ de sérum en présence d'antigène dans le premier temps de la réaction est donc : $\frac{x}{0,02} - 1$ (l'unité retranchée représentant la quantité de complément libre qui a servi à l'hémolyse dans le deuxième temps de la réaction). Le titre du sérum est donc $\frac{x}{0,02} - 1$ (Remarque).

TABLEAU 7

Permettant de calculer directement le titre d'un sérum (nombre d'unités 50 0/0 de complément fixées) soumis à la réaction quantitative décrite dans le tableau 6.

		Numéro des tubes « réaction »				
		1	2	3	4	5
Pourcentage d'hémolyse dans les tubes « réaction ».	100	0	4	9	14	19
	90	0	4,5	9,5	14,5	19,5
	80	0	5	10	15	20
	70	0,5	5,5	10,5	15,5	20,5
	60	1	6	11	16	21
	50	1,5	6,5	11,5	16,5	21,5
	40	2	7	12	17	22
	30	2,5	7,5	12,5	17,5	22,5
	20	3	8	13	18	23
	10	3,5	8,5	13,5	18,5	23,5

REMARQUE. — Il existe plusieurs manières d'exprimer le titre d'un sérum en fonction du nombre d'unités 50 0/0 de complément fixé [34] et Thompson a étudié l'aspect mathématique de ce problème [35].

Nous avons établi expérimentalement d'après ces données un *tableau* (tableau n° 7) permettant de calculer *directement* et avec une approximation suffisante le titre du sérum connaissant le pourcentage d'hémolyse compris entre 10 et 90 d'un seul tube de la réaction. Si deux tubes consécutifs présentent un pourcentage d'hémolyse compris entre 0 et 100, le titre du sérum sera la moyenne arithmétique entre les deux résultats ainsi trouvés.

Par exemple : si les pourcentages d'hémolyse observés dans chacun des cinq tubes « réaction » sont, dans l'ordre : 0, 0, 0, 40, 100, le titre du sérum est calculé d'après le pourcentage d'hémolyse du tube partiellement hémolysé, c'est-à-dire le 4^e tube présentant 40 0/0 d'hémolyse : le titre du sérum est 17, chiffre trouvé dans le tableau à double entrée n° 7. Si les pourcentages d'hémolyse sont respectivement 0, 0, 30, 90, 100, le titre du sérum calculé d'après le 3^e tube serait 12,5 ; calculé d'après le 4^e tube il serait 14,5. On prend pour titre du sérum la moyenne de ces deux chiffres, soit 13,5. Le calcul du titre du sérum ne doit se faire que d'après le pourcentage d'hémolyse des seuls tubes partiellement hémolysés. Mais, si on se trouve en présence d'une réaction où les pourcentages d'hémolyse dans les cinq tubes « réaction » sont respectivement 0, 0, 100, 100, 100, le calcul du titre se fait exceptionnellement d'après le premier tube où l'hémolyse est totale : soit ici le 3^e tube : le titre du sérum est 9.

— Le tube témoin du pouvoir anticomplémentaire du sérum doit présenter au moins 80 0/0 d'hémolyse. S'il présente un pourcentage d'hémolyse inférieur, c'est que le sérum est anticomplémentaire et fixe spontanément une certaine quantité de complément : il faut alors corriger le titre du sérum du nombre d'unités de complément fixées par le sérum seul : ce nombre est trouvé dans la colonne n° 1 du tableau précédent en regard du pourcentage d'hémolyse atteint dans ce tube témoin-sérum (Il est exceptionnel de trouver des sérums non altérés fixant spontanément plus de 4 unités de complément).

— Si le 5^e tube « réaction » lui-même ne présente aucune trace d'hémolyse, c'est que le sérum titre plus de 23,5. Il faut recommencer la réaction avec 0,05 cm³ d'une solution au 1/10 de ce sérum dans l'eau physiologique. Les résultats seront alors multipliés par 10, pour avoir le titre du sérum.

— La réaction quantitative ainsi réalisée est d'une très grande sensibilité, la moindre variation du taux de réagine dans un sérum se traduisant par une variation parallèle du nombre d'unités 50 0/0 de complément fixées.

CHAPITRE II

TITRAGE DE L'ANTIGÈNE A LA CARDIOLIPINE
EN VUE DE LA RÉACTION QUANTITATIVE DE FIXATION DU COMPLÈMENT

Le principe du titrage est le suivant :

— On recherche quelle est la *dose optima d'antigène* à la cardiolipine permettant la fixation du *nombre maximum d'unités 50 0/0* de complément en présence de $0,05 \text{ cm}^3$ d'un sérum syphilitique connu (on fait donc varier à la fois les doses d'antigène et les doses de complément, la dose de sérum restant fixe).

— En répétant cette épreuve avec d'autres sérums syphilitiques (de titres différents) on détermine les *doses optima d'antigène* permettant la fixation du *nombre maximum d'unités 50 0/0* en présence de $0,05 \text{ cm}^3$ de chacun de ces sérums.

— Il est alors possible d'établir une relation graphique entre ces *nombre maxima d'unités 50 0/0 fixées* (qui expriment le titre des différents sérums) et les *quantités optima d'antigène* correspondantes : la droite obtenue permet de calculer les doses optima d'antigène (c'est-à-dire les *titres de la suspension antigénique*) qu'il faut utiliser dans chacun des cinq tubes de la réaction quantitative.

Ce titrage est réalisé dans les mêmes conditions pratiques que la réaction quantitative qui vient d'être décrite.

I. — PRÉPARATION DES RÉACTIFS

— On choisit deux *sérums syphilitiques* différents et de titres moyens (le sérum n° 1 titrant environ 8 unités Kahn, le sérum n° 2, 16 unités Kahn : c'est-à-dire que la réaction de Kahn est encore positive avec ces sérums dilués respectivement au $1/2$ et au $1/4$). Ces sérums, chauffés $1/2$ heure à 56° ne doivent pas être anticomplémentaires. Chacun de ces sérums est utilisé pur, et dilué au $1/2$ avec de l'eau physiologique.

— Le *complément* titré à 50 0/0 d'hémolyse, est dilué de manière que 1 cm^3 de cette dilution contienne 50 unités 50 0/0 : soit $1/r$ le taux de cette dilution.

— On prépare dix *suspensions colloïdales d'antigène à la cardiolipine*

de concentrations croissantes (antigène pour réactions de fixation du complément préparé à l'Institut Pasteur) :

1 ^{re} suspension :	0,01 cm ³	d'antigène pur	dans 25 cm ³	d'eau salée à 8,5 o/oo.
2 ^e suspension :	0,02 cm ³	»	»	»
.....				
10 ^e suspension :	0,10 cm ³	»	»	»

Ces suspensions sont préparées avec les précautions indiquées dans le chapitre précédent.

— *Suspension de globules rouges de mouton sensibilisés et standardisés*, comme précédemment.

2. — MODE OPÉRATOIRE

Il s'agit d'effectuer avec chacun des sérums n° 1 et 2 et avec chacune des dilutions au 1/2 de ces sérums une *réaction quantitative à 5 tubes*, mais en utilisant dans tous les tubes la même suspension antigénique. On pratique parallèlement la même opération avec chacune des 10 suspensions antigéniques. Pour chaque sérum pur et chaque dilution de sérum il faut donc prévoir 50 tubes à hémolyse, soit 200 tubes au total (placés sur un portoir métallique rectangulaire).

Distribution des réactifs. — Dans chaque groupe de 5 tubes on distribue dans l'ordre (cf. tableau n° 8) :

- 0,05 cm³ de sérum inactivé (pur ou dilué) ;
- complément dilué à 1/r, à doses croissantes : 0,05 cm³ dans le 1^{er} tube, 0,15 cm³ dans le 2^e, etc... ;
- eau physiologique pour compléter le volume à 0,50 cm³ ;
- 1 cm³ de la suspension antigénique voulue.

On répète cette distribution 40 fois : d'une part pour le sérum n° 1, pour le sérum n° 2 et pour les dilutions au 1/2 de ces sérums, et d'autre part, pour chaque suspension antigénique.

— Pour chaque dilution d'antigène on prépare un tube contenant 1 cm³ de suspension antigénique et 0,05 de complément à 1/r : ces tubes sont les témoins du pouvoir anticomplémentaire possible de l'antigène.

Temps de fixation. — 6 heures à + 6-8°.

Temps d'hémolyse. — Les tubes sont réchauffés 10 minutes à 37° et on ajoute dans chacun, 1,5 cm³ de suspension de globules rouges de mouton sensibilisés. Les tubes sont alors abandonnés 45 minutes à 37°, puis centrifugés. On évalue au photolorimètre de Bonét-Maury le pourcentage d'hémolyse atteint dans chaque tube.

TABLEAU 8

Réaction quantitative de fixation du complément à effectuer avec chacun des sérums 1 et 2, purs et dilués au 1/2 et avec chacune des dix suspensions d'antigène à la cardiolipine, pour réaliser le titrage de l'antigène à la cardiolipine en vue de la réaction quantitative de fixation du complément appliquée au séro-diagnostic de la syphilis.

	Numéro des tubes				
	1	2	3	4	5
Sérum inactivé (n° 1 ou 2, pur ou dilué au 1/2)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Complément dilué à 1/r (50 unités 50 o/o dans 1 cm ³)	0,05	0,15	0,25	0,35	0,45
Eau salée à 0,85 o/o	0,40	0,30	0,20	0,10	—
Suspension antigénique (à essayer)	1	1	1	1	1
6 heures de fixation à 6-8° + 10' à 37°.					
G. R. sensibilisés (standardisés)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
45' à 37°. Centrifugation. Lecture photométrique du pourcentage d'hémolyse.					

3. — RÉSULTATS. INTERPRÉTATION DE LA COURBE ET CALCUL DU TITRE DE L'ANTIGÈNE

— Avec l'antigène que nous avons titré, les suspensions antigéniques ne montraient pas de pouvoir anticomplémentaire notable. (Les antigènes très anticomplémentaires, comme certains antigènes microbiens, ne peuvent être titrés par cette technique).

— Pour chacun des 40 groupes de 5 tubes, le nombre d'unités 50 o/o fixées en présence d'un des sérums et de l'une des 10 suspensions antigéniques est calculé soit graphiquement, soit à l'aide du tableau à double entrée du chapitre précédent (cf. tableau 7).

L'ensemble des résultats obtenus avec l'antigène essayé et les deux sérums syphilitiques choisis est représenté dans le tableau n° 9 : on voit que pour chaque sérum ou sa dilution il existe une suspension antigénique permettant la fixation du nombre maximum d'unités 50 o/o.

TABLEAU 9

Résultats du titrage d'un antigène à la cardiolipine. Pour le calcul des titres optima, voir la figure 4.

		Numéro de la suspension antigénique									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sérum inactivé	N° 1, pur . .	8	15	18	20,5	21	21,5	22	21,5	21	20
	N° 2, pur . .	7	10	12,5	13,5	13,5	12	11	9	8	6,5
	N° 1, au 1/2 .	5	8	10,5	11,5	11	9,5	9	8	6,5	5,5
	N° 2 au 1/2 .	3,5	6,5	7,5	7	6	5,5	4	3	2,5	2,5

On peut exprimer graphiquement ces résultats en portant en ordonnées le nombre d'unités 50 o/o fixées et en abscisse le nombre de centièmes de centimètre cube d'antigène pur contenus dans 25 cm³ de suspension antigénique.

On trace alors les quatre courbes joignant les points correspondant à chaque sérum ou à chaque dilution de sérum, c'est-à-dire à une quantité donnée de réagine syphilitique (cf. fig. n° 4).

— Chaque courbe passe par un *maximum* dont l'abscisse représente le *titre optimum* de la suspension antigénique à employer pour que la fixation du complément soit maxima en présence de cette dose de réagine. On voit nettement que dans tous les cas, la réaction est partiellement inhibée soit par excès, soit par défaut d'antigène.

— On constate que les différents titres optima ainsi déterminés sont croissants pour des quantités de réagine croissantes, ce qui justifie le fait d'employer des doses croissantes d'antigène dans les réactions quantitatives du type Calmette-Massol modifié. D'autre part, les sommets des courbes correspondant à ces titres optima peuvent être reliés par une ligne droite (en pointillé sur la figure).

— Cette ligne droite permet le calcul graphique des titres optima des suspensions antigéniques à utiliser dans la réaction quantitative. En effet, les 5 tubes de la réaction contiennent respectivement 2,5, 7,5, 12,5, 17,5 et 22,5 unités 50 o/o de complément, ce qui correspond à 1,5, 6,5, 11,5, 16,5 et 21,5 unités 50 o/o susceptibles d'être fixées (dans les conditions du

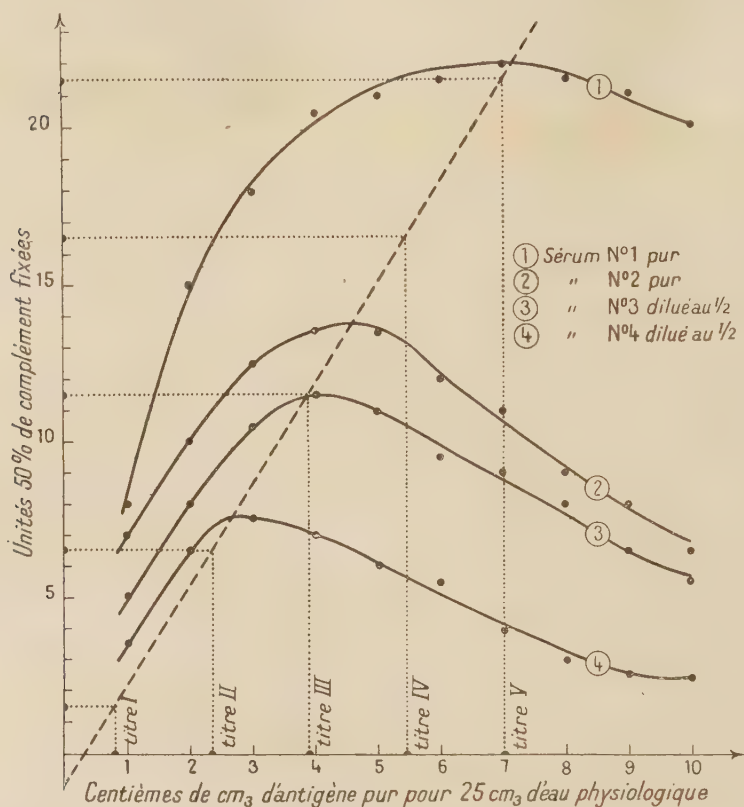


FIG. 4. — Courbes permettant le calcul des titres des suspensions d'antigène à la cardiolipine à employer dans chacun des cinq tubes de la réaction quantitative de fixation du complément (d'après les résultats mentionnés dans le tableau 9).

Erratum : Sur la figure 4, à la place de sérum n° 3 dilué au 1/2 et de sérum n° 4 dilué au 1/2, lire : sérum n° 1 dilué au 1/2 et sérum n° 2 dilué au 1/2.

titrage de l'antigène). L'abscisse du point d'ordonnée 1,5 de la droite est le titre de la suspension antigénique à employer dans le 1^{er} tube de la réaction ; celui d'ordonnée 6,5 dans le 2^e tube, etc... On a donc les résultats suivants :

Titre I : 0,008 cm^3 d'antigène pur dans 25 cm^3 d'eau physiologique (ou 0,01 cm^3 d'antigène pur dans 31 cm^3 d'eau physiologique).

Titre II : 0,0235 cm³ d'antigène pur dans 25 cm³ d'eau physiologique (ou 0,03 cm³ d'antigène pur dans 32 cm³ d'eau physiologique).

Titre III : 0,039 cm³ d'antigène pur dans 25 cm³ d'eau physiologique (ou 0,05 cm³ d'antigène pur dans 32 cm³ d'eau physiologique).

Titre IV : 0,0545 cm³ d'antigène pur dans 25 cm³ d'eau physiologique (ou 0,07 cm³ d'antigène pur dans 32 cm³ d'eau physiologique).

Titre V : 0,070 cm³ d'antigène pur dans 25 cm³ d'eau physiologique (ou 0,09 cm³ d'antigène pur dans 32 cm³ d'eau physiologique).

— On constate d'autre part qu'en présence de la quantité optima d'antigène la dose de 0,05 cm³ du sérum n° 1 fixe 22 unités 50 o/o et le même volume du sérum n° 1 dilué au 1/2 fixe 11,5 unités 50 o/o, soit environ la moitié. De même le sérum n° 2 fixe 14 unités 50 o/o et le sérum n° 2 dilué au 1/2 fixe 7,5 unités 50 o/o. Il existe donc une relation à peu près linéaire (du type $y=x$) entre la quantité de réagine réellement présente dans un sérum et le nombre d'unités 50 o/o de complément fixées en présence de la dose optima d'antigène. En effet (cf. tableau n° 9) cette relation est beaucoup moins bien respectée si d'autres doses d'antigène sont utilisées.

4. — INFLUENCE DE LA COMPOSITION DE L'ANTIGÈNE A LA CARDIOLIPINE

Les antigènes classiques utilisés pour le séro-diagnostic de la syphilis étaient des extraits alcooliques d'organes animaux contenant un mélange complexe de différents phospho-amino-lipides présents en proportion variable. Pangborn ayant prouvé que parmi ces lipides, c'est celui qu'elle a isolé à l'état très purifié, appelé *cardiolipine*, qui est responsable de la *spécificité* des réactions, s'aperçut que cette cardiolipine seule était inutilisable dans les réactions. Les Maltaner [36] montrèrent en effet à propos des réactions de fixation du complément :

— que la suspension de *cardiolipine* seule dans l'eau physiologique est fortement anticomplémentaire, donc inutilisable ;

— que la *lécithine* en proportion convenable corrigeait ce pouvoir anticomplémentaire ;

— que le *cholestérol* augmentait la réaction du mélange en augmentant, comme l'avait montré Eagle [17], la dimension des micelles antigéniques qui forment ainsi avec la réagine un complexe plus volumineux, donc capable de fixer plus de complément.

Il existe une quantité optima de chacun de ces trois lipides en solution alcoolique permettant d'obtenir une suspension antigénique de réactivité maxima et de spécificité convenable. L'antigène semi-synthétique ainsi préparé, de composition centésimale connue, est doué de propriétés à peu

près constantes. Mais on ne peut se dispenser de titrer sérologiquement toute nouvelle préparation d'antigène, les propriétés antigéniques de chacun des trois lipides pouvant varier malgré la constance relative des critères de leur pureté chimique.

En résumé, il est nécessaire d'employer dans la réaction quantitative de fixation du complément des suspensions antigéniques titrées suivant cette méthode. Ce titrage doit se faire chaque fois que l'on emploie un antigène à la cardiolipine de numéro de fabrication différent de celui de l'antigène précédemment utilisé. L'antigène conservé en ampoules scellées à l'abri de la lumière étant relativement stable il suffit de vérifier son titre tous les six mois environ.

CHAPITRE III

ÉTUDE DES DIFFÉRENTS FACTEURS INTERVENANT DANS LA FIXATION DU COMPLÉMENT

La caractéristique de la réaction quantitative que nous venons de décrire est d'employer le complément titré à 50 o/o d'hémolyse et une suspension d'antigène à la cardiolipine au titre optimum. Tout est donc réalisé pour rendre cette réaction très sensible ; ce qui entraîne comme conséquence que les conditions physico-chimiques dans lesquelles la réaction est effectuée doivent être déterminées de façon très précise car elles ont une influence sur la marche de la fixation.

I. — INFLUENCE DE L'ÉTAT PHYSICO-CHIMIQUE DU SÉRUM SYPHILITIQUE

Pour un sérum donné, le nombre d'unités 50 o/o fixées dépend des traitements subis par ce sérum.

— *Le chauffage*. — L'inactivation par chauffage a pour but de détruire le complément naturel du sérum, elle a aussi pour effet de modifier plus ou moins, suivant le temps et la température choisie, l'équilibre physico-chimique de ce sérum, ce qui se traduit par une aptitude plus ou moins grande à fixer le complément en présence d'antigène. Hazen [37] a montré que pour une durée de 30 minutes la fixation du complément est maximale si le sérum avait été chauffé à 56°. Le nombre d'unités 50 o/o fixées dans ces conditions serait le double du nombre fixé si le sérum a été chauffé à 53° ou à 60°.

— *Le vieillissement*. — Les sérums conservés à l'état congelé gardent

pratiquement leur titre originel pendant plusieurs mois. Par contre la baisse de titre est notable si le sérum n'a pas été conservé à l'état congelé, surtout s'il n'est pas stérile. Il faut de préférence titrer les sérums dans la semaine qui suit leur prélèvement.

— *Le liquide de dilution.* — Lorsqu'il est nécessaire de diluer le sérum, le choix du liquide de dilution n'est pas indifférent. Plusieurs auteurs diluent le sérum syphilitique avec un sérum humain normal et non syphilitique de manière à ce que la réaction soit toujours effectuée en présence de la même quantité de protéines totales. Mais nous avons constaté qu'avec de rares sérums apparemment normaux, les conditions de fixation se trouvaient ainsi modifiées ; c'est pourquoi malgré l'inconvénient théorique que cela représente, nous préférons diluer les sérums avec de l'eau physiologique qui n'apporte aucun élément inconnu dans la réaction et permet d'obtenir des résultats, peut-être moins exacts, mais plus constants.

2. — INFLUENCE DE L'ÉTAT PHYSICO-CHIMIQUE DE LA SUSPENSION COLLOÏDALE D'ANTIGÈNE

Il faut respecter à la lettre le mode de préparation des suspensions antigéniques sous peine de modifier la dimension des micelles, ce qui entraîne une modification des conditions de fixation, donc du nombre d'unités 50 o/o fixées.

3. — INFLUENCE DES ÉLECTROLYTES

Le complément n'est pas fixé en l'absence d'électrolytes, ou en présence d'un excès. D'après Eagle, la concentration optima en ClNa est de 8,5 o/oo [17].

4. — INFLUENCE DU MODE OPÉRATOIRE ADOPTÉ

— *Ordre de distribution des réactifs.* — Plusieurs essais nous ont montré qu'il n'est pas indifférent de distribuer le complément avant l'antigène ou inversement (le sérum étant toujours distribué en premier) : si on laisse 20 minutes en contact l'antigène et le sérum avant d'ajouter le complément, le nombre d'unités 50 o/o fixées est toujours inférieur à celui fixé lorsque l'on ajoute le complément avant l'antigène : le complément se fixe mieux sur un complexe réagine-cardiolipine en train de se former que sur un complexe déjà formé (Goldsworthy) [38].

— *Temps et température de fixation.* — Indépendamment du rôle qu'ils jouent dans la destruction spontanée du complément, le temps et la

température ont une influence capitale sur l'intensité de la fixation. En étudiant le système polysaccharide du pneumocoque III — sérum homologue, Rice [30] a montré qu'il se fixe deux à trois fois plus de complément à 3° - 6° pendant 24 heures qu'à 37° pendant 1 h. 1/2. On note une influence comparable de ces deux facteurs lorsque l'on étudie le système réagine-cardiolipine. Dans la figure 5 sont représentés les résultats que nous avons

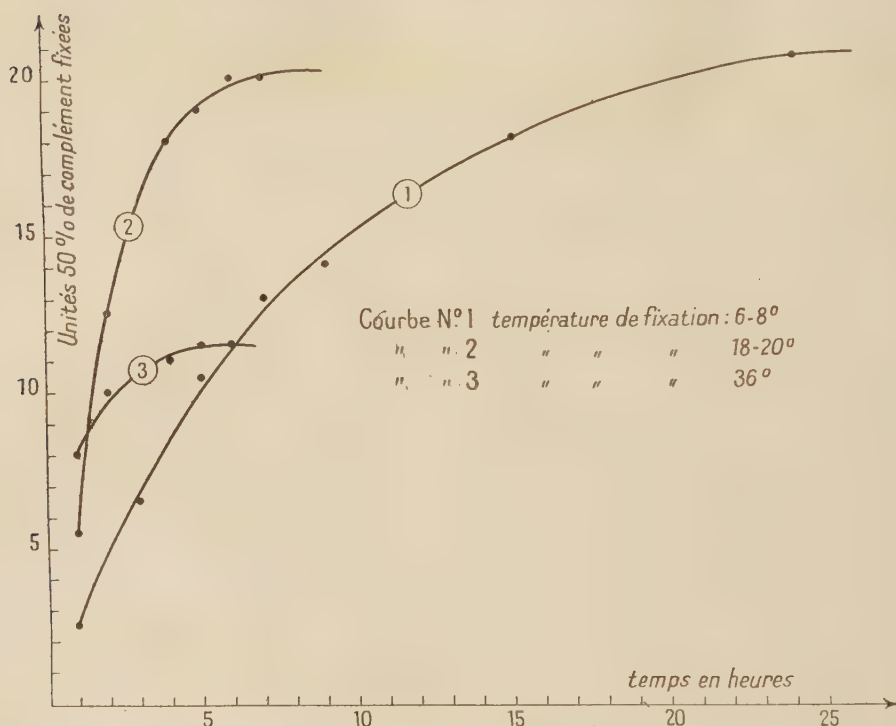


FIG. 5. — Variations du titre apparent d'un sérum syphilitique en fonction de la température et du temps de fixation adoptés dans la réaction.

obtenus en mesurant le titre d'un même sérum syphilitique dans différentes conditions de temps et de température. Cette expérience répétée avec d'autres sérums permet de constater que ces deux facteurs ont une influence relative plus ou moins marquée suivant le sérum (donc suivant la qualité de la réagine). Mais l'allure générale des courbes est toujours la même pour une température donnée : le nombre d'unités 50 o/o fixées croît avec le temps jusqu'à atteindre un certain maximum ; on peut tirer de ces courbes les conclusions suivantes :

— La fixation est plus lente mais atteint un niveau plus élevé à basse température qu'à 37°.

— L'intensité de la fixation est pratiquement la même à 20° et à 6° mais la vitesse est plus grande à 20°.

— Les différents points de ces courbes expriment les titres d'un *même* sérum lorsque la réaction est pratiquée dans des conditions différentes : elles montrent donc nettement la nécessité d'opérer toujours dans des conditions rigoureusement identiques de temps et de température.

Nous avons choisi la température de 6°-8° parce qu'il est plus facile de la maintenir constante dans un réfrigérateur à thermostat. Le temps relativement court de 6 heures nous a paru préférable car ainsi la relation linéaire du type $y=x$ qui doit exister entre la quantité de réagine du sérum et le nombre d'unités 50 o/o fixées est mieux respectée que lorsqu'on prolonge de temps de fixation pendant 16 ou 18 heures.

5. — INFLUENCE DU COMPLÉMENT

La composition du complément, c'est-à-dire sa teneur en chacun des quatre composants, C/1, C/2, C/3, C/4 influe sans doute beaucoup sur les conditions dans lesquelles s'opère la fixation, donc en définitive sur son intensité. En titrant l'alexine par la réaction d'hémolyse, on mesure l'activité hémolytique de ce réactif mais on ne possède pas la preuve que cette activité varie toujours dans le même sens que la capacité de se fixer sur un complexe antigène-anticorps. Il ressort en effet des travaux de nombreux auteurs (Pillemer, Ecker, Heidelberger et ses collaborateurs) [39, 40, 41, 42] que le troisième composant C/3 qui joue un rôle prépondérant dans l'hémolyse (rôle de catalyseur), a au contraire un rôle mineur et même nul dans la fixation de l'alexine sur les complexes antigène-anticorps. On peut, par la méthode d'Hegedus et Greiner [43] titrer séparément chacun des quatre composants : ce qui a permis de constater que deux compléments doués de la même activité hémolytique vis-à-vis des hématies de mouton ne contenaient pas toujours la même quantité de chacun des quatre composants : il n'existe pas de complément parfaitement équilibré. Et c'est sans doute la raison pour laquelle on observe parfois le fait suivant : si l'on titre un sérum avec deux compléments différents mais dilués chacun au titre voulu (1 cm³ de dilution contenant 50 unités 50 o/o) on constate quelquefois que le nombre d'unités 50 o/o fixées n'est pas le même avec les deux compléments (la différence pouvant atteindre 50 o/o en plus ou en moins). Cela se produit :

— rarement lorsque les compléments sont récents ;

— plus fréquemment lorsque l'un des compléments a été conservé pendant plusieurs mois.

Il est impossible de se prémunir d'une façon absolue contre cette cause d'erreur qui tient à la nature biologique du réactif employé. Pourtant, il est recommandé :

— de ne pas employer de compléments conservés depuis plus de 30 ou 40 jours ;

— d'essayer l'activité fixatrice de tout nouveau complément : dans ce but, nous pratiquons des réactions quantitatives sur le *même* sérum avec d'une part, chaque complément nouveau et d'autre part, un complément connu et satisfaisant : nous éliminons tous les compléments donnant une fixation nettement plus faible ou plus élevée que la fixation obtenue avec le complément témoin : la différence ne doit pas excéder 10 o/o en plus ou en moins.

En résumé, si les réactions quantitatives sont exécutées suivant un mode opératoire rigoureusement standardisé, les résultats doivent être, en principe, indépendants de tous les facteurs que nous venons d'énumérer. Mais il ne faut pas oublier que cette réaction n'est pas une réaction chimique courante dans laquelle les réactifs sont en général définis et invariables : c'est une réaction biologique dont le mécanisme n'est pas bien connu. De ce fait, les résultats ne sont pas absolument constants. Nous estimons que dans notre technique l'erreur relative sur les résultats est de 10 o/o si les conditions opératoires sont bien respectées : il faut en tenir compte dans l'interprétation des courbes syphilimétriques dont nous allons parler. Bien entendu cette erreur est beaucoup plus considérable et la sérologie quantitative devient illusoire lorsqu'on opère dans de mauvaises conditions.

TROISIÈME PARTIE

APPLICATION A L'ÉTUDE DES COURBES SYPHILIMÉTRIQUES

Quel est l'intérêt des réactions sérologiques quantitatives en syphiligraphie ? Jusqu'à ces dernières années, cet intérêt semblait très limité à la plupart des auteurs et seul Vernes, en France, basait tout son traitement sur l'étude de la courbe syphilimétrique établie à l'aide de sa technique de floculation, le Vernes-Péréthynol. A partir de 1943, les auteurs américains commencèrent à traiter la syphilis récente par la pénicilline. Le contrôle de l'efficacité de ce traitement court et intense, ne peut se faire qu'en sui-

vant l'évolution de la courbe sérologique du malade. Mais, l'interprétation immunologique de cette courbe, et les conclusions qu'en tirent les auteurs américains sont essentiellement différentes de l'interprétation et des conclusions de Vernes.

Il est une question capitale qui domine tout ce problème : *la substance contenue dans le sérum des syphilitiques et mesurée par les diverses techniques sérologiques peut-elle être considérée ou non comme un anticorps ?* De la réponse dépend l'interprétation de la courbe sérologique et par conséquent les directives à suivre dans la conduite du traitement.

Pour Vernes [44], cette substance spéciale aux sérums syphilitiques et réagissant avec le Péréthynol (suspension dans l'eau bidistillée de lipides extraits du cœur de cheval) n'est pas un anticorps, mais un produit d'excrétion du tréponème déversé dans le sang et qu'il appelle la « pallidine ». La présence de pallidine dans le sérum (c'est-à-dire une réaction de Vernes positive) est donc, pour cet auteur, la preuve de la présence de tréponèmes dans l'organisme et les variations de la courbe syphilométrique sont le reflet des variations de la pullulation du germe. Si le taux de pallidine se maintient à zéro, cela indique que les tréponèmes ont définitivement disparu, et le traitement doit donc être poursuivi jusqu'à ce moment.

La thèse des auteurs américains est toute différente : pour eux, la substance que l'on décèle dans le sérum des syphilitiques, appelée réagine et qui permet le diagnostic de la maladie, doit être considéré comme un anticorps, car sa production et ses variations dans l'organisme humain sont soumises aux mêmes lois immunologiques que les anticorps en général. Ces conclusions amènent à formuler des directives très précises, et qui paraissent même souvent révolutionnaires, pour la conduite du traitement.

Quels sont les arguments pour et contre cette thèse ?

SPÉCIFICITÉ DES RÉACTIONS SÉROLOGIQUES DE LA SYPHILIS

Neurath et ses collaborateurs [31] ont montré que la réagine syphilitique est une globuline γ de la classe des anticorps. Cette réagine forme *in vitro* un complexe avec la cardiolipine, lipide extrait du cœur de bœuf par Pangborn [32-33] ; la formation et les propriétés de ce complexe sont en tous points comparables à celles des complexes spécifiques antigène-anticorps. Mais la cardiolipine, lipide banal rencontré dans la plupart des organes animaux, n'est probablement pas un antigène étroitement spécifique du tréponème, et la réaction qui habituellement permet la recherche

et le dosage de la réagine syphilitique, n'est pas une réaction spécifique dans le sens immunologique du mot.

A-t-on une *preuve directe* que la réagine soit un anticorps spécifique du tréponème ? C'est-à-dire, existe-t-il une réaction spécifique, *in vitro*, entre le tréponème et cette globuline γ ? On avait fondé de grands espoirs sur l'emploi dans de telles réactions, d'antigènes préparés à partir du tréponème lui-même : c'est la Pallida-réaction de Gaetgens, employant comme antigène une émulsion aqueuse et phénolée de tréponèmes de culture (souche Reiter). La question a été reprise par de nombreux auteurs (Vogelsang [45], Eagle, Kolmer, Carlinfanti, etc...) se servant de la même souche Reiter ou de la souche Nicolle. Mais les conclusions ont été divergentes : la raison en est sans doute que les tréponèmes de culture, *avirulents*, sont antigéniquement très différents des tréponèmes *virulents* présents chez les syphilitiques. Récemment, Nelson et Mayer [46], ont démontré la présence dans les sérums syphilitiques d'un anticorps qui, en présence de complément de cobaye, *immobilise* les tréponèmes *virulents* et *mobiles* extraits de syphilomes de lapin. La réaction s'effectue avec une suspension de tréponème dans un milieu spécial qui en conserve la mobilité. Or Nelson et ses collaborateurs [55], pensent que la réagine est différente de l'anticorps immobilisateur : les variations du taux de cet anticorps sont parallèles, mais retardées dans le temps par rapport aux variations de la réagine : l'anticorps immobilisateur est encore présent dans le sérum alors que la réagine a déjà disparu.

Cette absence de preuves directes de la spécificité de la réagine ne permet pas d'affirmer que la réagine n'est pas un anticorps. On connaît en immunologie de nombreux exemples de communauté d'haptènes entre des antigènes naturels de provenance très variée (haptène de Forssman par exemple). En pathologie on connaît de la même façon des germes provoquant la formation d'anticorps mis en évidence par une réaction non spécifique : l'anticorps correspondant à la Rickettsie du typhus exanthématique est recherché par la réaction qui se produit entre cet antigène et le Proteus X¹⁹. L'anticorps de la mononucléose infectieuse (maladie causée très probablement par un virus non encore isolé), possède la propriété d'agglutiner les globules rouges de mouton : cette agglutination est inhibée par l'extrait de globules rouges de bœuf (qui doit contenir un antigène commun avec le virus de la mononucléose infectieuse), mais n'est pas inhibée par l'extrait de rein de cobaye (antigène de Forssman) ce qui différencie les agglutinines de la mononucléose des agglutinines normales du type Forssman (réaction de Paul, Bunnell et Davidsohn). Toutes ces réactions non spécifiques, mais d'un grand intérêt pratique, peuvent donc s'expliquer par

des analogies étroites de la constitution physico-chimique des groupements haptènes de ces antigènes. De même pour la syphilis, le tréponème possède des lipides constitutifs qui sont sans doute identiques ou très voisins de la cardioliopine de Pangborn.

Mais, si du fait de l'imperfection des antigènes actuellement employés dans la sérologie de la syphilis, il n'y a pas de preuve directe que la réagine soit bien un anticorps, il existe par contre tout un faisceau de *preuves indirectes* fournies par la comparaison entre les variations du taux de la réagine au cours de la syphilis et celles du taux de l'anticorps observées au cours des maladies infectieuses ou de l'immunisation expérimentale, notions classiques d'immunologie générale que nous allons rappeler brièvement (Bordet [7], Boyd [47]). *La réagine constitue bien une réponse immunologique de l'organisme à l'introduction du Treponema pallidum* (Eagle) [48]

LOIS D'APPARITION DES ANTICORPS DANS LE SÉRUM

L'intensité et la durée de la réponse sérologique d'un animal à l'introduction d'un antigène dans son organisme sont très différentes, le taux d'anticorps obtenu varie suivant les individus, et aussi suivant l'antigène et son mode d'introduction (voie orale, intraveineuse, intrapéritonéale ou sous-cutanée). Mais les courbes de variation du taux d'anticorps en fonction du temps ont toujours la même allure quels que soient l'antigène, le mode d'introduction et l'espèce animale considérée. Dans l'immunisation on distingue nettement deux périodes : la période qui suit le premier contact de l'organisme neuf avec l'antigène, durant laquelle le taux d'anticorps monte régulièrement jusqu'à atteindre un maximum ; ensuite l'allure de la courbe sérologique change suivant que l'on maintient ou non l'organisme en contact avec l'antigène.

Première période. — L'apparition de l'anticorps dans le sérum ne commence qu'un certain temps après le premier contact de l'organisme neuf avec l'antigène (l'antigène peut être introduit artificiellement par injection ou un germe peut le déverser au fur et à mesure de sa pullulation dans l'organisme). *Cette phase de latence* est variable, de quelques jours à quelques semaines. Puis le taux d'anticorps monte assez rapidement et la courbe atteint un *maximum*.

Deuxième période. — Une fois ce maximum atteint, trois cas sont à envisager :

1° Si l'organisme n'est plus soumis à l'imprégnation antigénique (soit que l'on ait cessé les injections d'antigène, soit que le germe ait été tué par un traitement approprié ou par une réaction de défense de l'orga-

nisme), le taux d'anticorps baisse lentement jusqu'à s'annuler au bout d'un laps de temps plus ou moins long (de quelques mois à quelques années).

2° Si à un moment donné de cette phase descendante de la courbe sérologique, l'organisme est mis de nouveau en contact avec l'antigène (*injection de rappel* ou reprise de l'infection microbienne) le taux d'anticorps *remonte*, et en général *plus vite et plus haut* que lors du premier contact. C'est ce qu'on appelle en immunologie la *réaction anamnétique* [47] : l'organisme est considéré comme étant encore en état d'alerte. La courbe sérologique redescend ensuite normalement et atteint le niveau zéro si l'imprégnation antigénique cesse.

3° Si au contraire l'organisme est soumis à un contact quasi permanent avec l'antigène (injections répétées ou infection microbienne chronique) le taux d'anticorps après avoir atteint un maximum baisse un peu mais se *stabilise* toujours à un certain niveau. Tout se passe comme si l'organisme avait contracté l'habitude de produire cet anticorps à un taux constant et conservait cette faculté à peu près indéfiniment alors même que toute excitation antigénique a cessé depuis longtemps.

ÉVOLUTION DU TAUX DE RÉAGINE DANS LE SANG AU COURS DE LA SYPHILIS

L'évolution du taux de réagine dans le sang au cours de la syphilis, est tout à fait comparable à l'évolution du taux d'anticorps observée au cours de l'immunisation expérimentale par un antigène quelconque d'origine microbienne ou non, *ce qui constitue une preuve indirecte que la réagine est un anticorps spécifique du tréponème*. Ce fait n'a pu être mis clairement en évidence par les auteurs américains que grâce au concours simultané de deux facteurs capitaux :

— Traitement rapide de la syphilis récente par la pénicilline, conduit dans des conditions rigoureuses et expérimentalement établies (pénicillémie maintenue au-dessus du taux minimum de 0,02 unités Oxford par centimètre cube pendant au moins 72 ou 96 heures), permettant de stopper net la croissance du tréponème et d'arrêter ensuite le traitement (la courbe syphilimétrique se développe ainsi dans des conditions plus comparables aux conditions de l'immunisation expérimentale).

— Contrôle sérologique minutieux de l'évolution du taux de réagine par des examens rapprochés dans le temps et répartis sur plusieurs mois au minimum. N'importe quelle technique quantitative précise de flocculation ou de fixation du complément peut être employée pourvu qu'elle soit fidèle, c'est-à-dire que les résultats obtenus soient indépendants de tout autre fac-

teur que la richesse en réagine du sérum analysé. On doit pourtant donner la préférence aux techniques les plus sensibles et à celles permettant d'établir une relation linéaire entre le titre du sérum et la quantité de réagine réellement présente dans ce sérum. Croyant avoir démontré que la technique quantitative de fixation du complément que nous venons de décrire remplissait ces différentes conditions, il nous a semblé intéressant de l'employer pour établir quelques courbes syphilimétriques, illustrant les théories américaines sur l'interprétation immunologique de ces courbes (Mahoney, Thomas, etc...) [49, 50, 51, 52, 53, 54] (1).

I. — COURBES SYPHILIMÉTRIQUES DE MALADES ATTEINTS DE SYPHILIS RÉCENTE ET TRAITÉS PRÉCOCEMENT

OBSERVATION n° 1. — M. A..., 38 ans. *Syphilis primaire*. Se présente à la consultation avec un chancre du sillon balano-préputial (ultra-positif). La contamination paraît remonter à trois semaines environ. Hospitalisé pour le traitement.

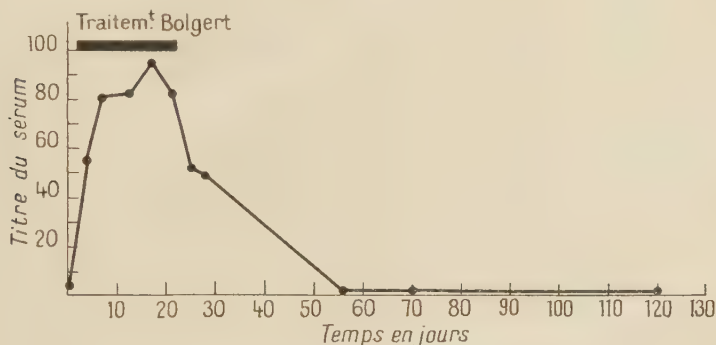


FIG. 6. — Courbe syphilimétrique n° 1 : *Syphilis primaire*. Malade traité dans le service du Dr Tzanek.

Traitement à la pénicilline suivant la technique du Dr Bolgert, c'est-à-dire :

- 0,01 CNIlg par jour durant 3 jours.
- 200, 300 et 500.000 U. I. de pénicilline les 4^e, 5^e et 6^e jours.
- Ensuite 1 million U. I. de pénicilline par jour pendant 14 jours.
- Arrêt du traitement.

Contrôle sérologique quantitatif (par notre réaction quantitative de fixation du complément) pendant 120 jours (à poursuivre). Cf. courbe n° 1.

(1) Nous devons nos observations cliniques à l'obligeance du Dr Tzanek qui, à l'Hôpital Saint-Louis, a mis à notre disposition les malades qu'il fait traiter dans son dispensaire de syphiligraphie par le Dr Moline. Nous tenons à remercier le Dr Moline de l'aide qu'il nous a ainsi apportée dans l'exécution de notre travail.

OBSERVATION N° 2. — M. C..., 37 ans. *Réinfection*. A contracté deux ans auparavant une syphilis dont il pouvait être considéré comme guéri à la suite d'un traitement suivi dans le service. Sérologie négative. Se présente de nouveau avec deux érosions du sillon balano-préputial de siège distinct du premier chancre (ultra-positif). Contamination paraissant remonter à une dizaine de jours. Hospitalisé pour le traitement.

Traitement à la pénicilline suivant la technique du Dr Bolgert.

Contrôle sérologique quantitatif pendant 90 jours (à poursuivre). Cf. courbe n° 2.

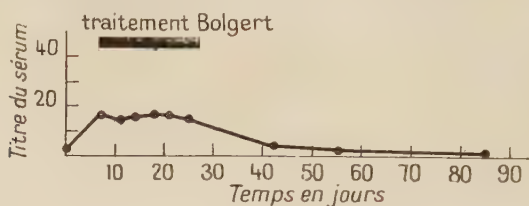


FIG. 7. — Courbe syphilimétrique n° 2 : Syphilis primaire (*Réinfection*).
Malade traité dans le service du Dr Tzanck.

OBSERVATION N° 3. — M^{me} D..., 35 ans. *Syphilis secondaire*. Éruptions papulo-squameuses, prenant aspect lichénifié, aux avant-bras, coude, abdomen. Amygdale rouge, enflée. Adénopathie sous-maxillaire. Hospitalisée pour le début du traitement (15 jours).

Traitement. — Durant les 15 premiers jours, reçoit un total de 8.400.000 U. I. de pénicilline, plus 5 injections de BivatoI.

— du 16^e au 63^e jour : 15 injections de BivatoI;

— 3 semaines de reposit.

Contrôle sérologique quantitatif pendant 70 jours (à poursuivre). Cf. courbe n° 3.

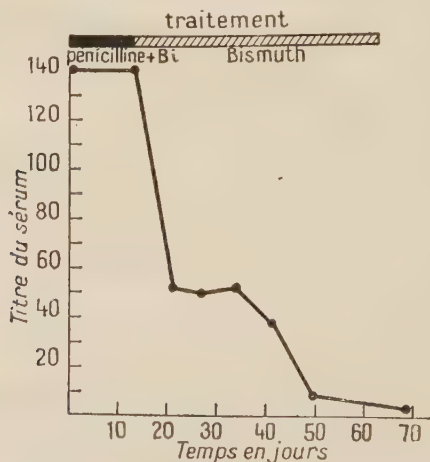


FIG. 8. — Courbe syphilimétrique n° 3 : Syphilis secondaire.
Malade traité dans le service du Dr Tzanck.

Interprétation des courbes. — La forme des courbes obtenues correspond bien au schéma général dont nous avons parlé. Voici comment on peut les interpréter. Chaque courbe comprend trois parties.

1° L'ascension plus ou moins régulière du taux de réagine est précédée d'une *phase de latence* où la réponse sérologique de l'organisme à l'impregnation antigénique par le tréponème n'est pas encore perceptible, alors que les signes cliniques et bactériologiques sont déjà apparus (chancres avec ultra-positif) (Dans nos observations cette phase n'a pas été observée). L'augmentation rapide du taux de réagine qui suit cette phase de latence constitue la réponse normale d'un organisme neuf à un premier contact avec le tréponème en voie de multiplication.

2° Si sous l'effet d'un traitement précoce et intensif la croissance des tréponèmes est stoppée et les tréponèmes tués ou du moins la plus grande partie d'entre eux, l'excitation antigénique cesse. La courbe de réagine, toujours avec un certain retard sur la disparition des tréponèmes, cesse de croître et atteint un *maximum*. La valeur absolue de ce maximum n'a pas grande signification : il ne permet de juger ni de la gravité ni de l'évolution ultérieure de la maladie, le rôle capital étant joué par la susceptibilité de l'individu et le temps séparant la contamination du début du traitement. La courbe se maintient à ce maximum pendant quelques jours.

3° La courbe syphilimétrique *décroît* ensuite : c'est cette phase de défervescence qui a le plus d'intérêt pratique et qui doit être suivie avec le plus d'attention. Deux cas sont à envisager.

a) Si le traitement a été suffisant et efficace, les tréponèmes ont définitivement disparu et le taux de réagine baisse d'une façon plus ou moins régulière pour s'annuler enfin. Le temps précédant la négativation sérologique est variable suivant les individus et suivant l'intervalle séparant le début de la maladie du début du traitement. Il est en général de 2 ou 3 mois et ne doit pas excéder 6 à 8 mois.

La signification immunologique de cette décroissance alors que le tréponème a depuis longtemps disparu est la suivante : la réponse sérologique de l'organisme à l'excitation antigénique initiale se prolonge comme un écho. Deux des observations rapportées appartiennent à cette catégorie (Observations 1 et 3). Les auteurs américains recommandent d'effectuer un examen quantitatif toutes les semaines pendant 6 mois et ensuite, si la sérologie est négative, un examen tous les 6 mois pendant 2 ou 3 ans. Chaque examen sérologique étant évidemment accompagné d'un examen clinique.

b) Cette surveillance est nécessaire : si le traitement n'a pas été suffisamment efficace et a permis à certains tréponèmes de survivre, ces tréponèmes vont obligatoirement un jour ou l'autre reprendre une croissance active, et

le malade fait une « rechute ». Il peut se produire aussi une *réinfection*. De toute manière l'organisme soumis de nouveau à une imprégnation antigénique massive des tréponèmes répondra en formant un taux élevé de nouveaux anticorps. La courbe, jusqu'alors descendante, va monter brusquement et cette remontée *précédera toujours* l'apparition de nouveaux signes cliniques (on ne signale pas de chancres après réinfection chez des malades présentant encore une sérologie positive) et commandera la reprise du traitement. Il est donc capital de détecter cette augmentation du taux de réagine et de ne pas la confondre avec les oscillations peu marquées de la courbe que l'on peut considérer comme normales. Il y a « *relapse* » suivant l'expression américaine lorsque la réagine remonte brusquement à un taux nettement plus élevé que le taux initial et s'y maintient ou monte encore durant 3 semaines au minimum. Comme nous l'avons dit, cette remontée de la courbe équivaut à l'élévation du taux d'anticorps suivant une injection de rappel : c'est la réaction anamnétique bien connue des immunologistes. Rechutes ou réinfections cèdent à un nouveau traitement et la courbe reprend de nouveau sa phase descendante. On peut observer plusieurs « relapses » chez un même individu.

Nous n'avons pas suivi un nombre suffisant de malades pour observer de rechutes qui se produisent suivant les auteurs américains dans 2 ou 3 o/o des cas. Mais nous avons observé un cas de réinfection chez un malade dont la sérologie était devenue négative après traitement (Observation n° 2). Chez de tels malades le chancre apparaît en cas de nouvelle contamination et précède alors l'ascension de la courbe qui est semblable à la courbe obtenue avec un malade atteint de syphilis primaire : l'organisme s'est comporté exactement comme un organisme neuf.

2. — COURBES SYPHILIMÉTRIQUES DE MALADES ATTEINTS DE SYPHILIS ANCIENNES OU HÉRÉDITAIRES DITES « SÉRO-RÉSISTANTES »

OBSERVATION N° 4. — M. L..., *syphilis héréditaire*. Sérologie positive découverte en 1945 au cours d'un examen systématique lors du rapatriement des prisonniers. Aucun signe clinique, aucun trouble, affirme n'avoir jamais contracté la syphilis. Une enquête établit que son père était syphilitique. Le diagnostic de syphilis héréditaire est posé, diagnostic qui semble confirmé par le fait que la sœur de ce malade présente de même une sérologie positive sans signes cliniques.

Traitement. — A été régulièrement traité depuis 1945 suivant les méthodes classiques : durant les 70 premiers jours de l'observation, a reçu 20 injections de Bivitol.

Contrôle sérologique quantitatif pendant 150 jours (Cf. courbe n° 4).

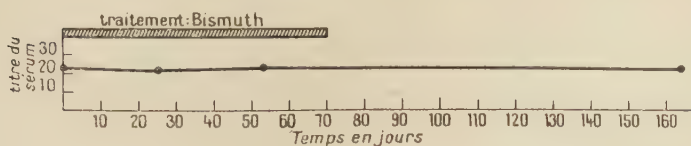


FIG. 9. — Courbe syphilimétrique n° 4 : Syphilis héréditaire.
Malade traité dans le service du Dr Tzanck.

Interprétation. — L'organisme a été soumis pendant un temps prolongé à l'imprégnation antigénique du tréponème : il a acquis l'habitude de produire de la réagine et la conserve après même que le tréponème a disparu. Le taux de réagine *reste constant* et n'est pas influencé par le traitement ni par l'absence de traitement : c'est ce que l'on désigne souvent sous le terme de *cicatrice sérologique*. Une rechute clinique peut ne pas être précédée d'une augmentation de la réagine. Il est donc difficile de conclure par l'examen de ces courbes à l'existence ou à l'absence d'un foyer tréponémique en activité, et seul l'examen clinique peut permettre de décider de la reprise ou de l'arrêt du traitement.

3. — INTÉRÊT DES COURBES SYPHILIMÉTRIQUES POUR LE DIAGNOSTIC DES « FAUSSES RÉACTIONS »

L'existence de réactions faussement positives dites « biologiques » est un fait bien connu. Spontanément ou sous des influences diverses (nombreuses maladies infectieuses, vaccination jennérienne, grossesse, certaines médications, etc...) il peut apparaître dans le sang et par un mécanisme encore inexpliqué, des globulines qui se comportent vis-à-vis de la cardiolipine comme la réagine syphilitique. Ces fausses réagines ont un caractère transitoire ou permanent (le cas est fréquent chez certains individus de race noire en particulier).

Il est évident que cette confusion entre vraie et fausse réagine est imputable à l'imperfection de l'antigène (cardiolipine) employé dans les réactions : nous avons dit que la cardiolipine n'est pas l'antigène spécifique du tréponème, mais possède sans doute avec lui une certaine communauté d'haptène, il n'y a donc rien d'étonnant à ce que cette cardiolipine réagisse avec une globuline possédant une structure très proche de celle de la réagine syphilitique.

Le problème des fausses réactions sera beaucoup moins inquiétant lorsque l'on aura un antigène réellement spécifique, en particulier le jour que l'on peut croire assez proche où le test de Nelson, ou un test analogue, seront d'un usage courant. Ce test dont nous avons parlé est évidemment spécifique puisque l'antigène appartient au tréponème virulent lui-même. Il a déjà donné à ce point de vue des résultats probants (55), mais sa réalisation se heurte à des difficultés techniques telles qu'il ne peut encore être exécuté que dans de rares laboratoires.

En attendant, la sérologie quantitative apporte, non pas une certitude, mais un élément de diagnostic nouveau dans l'étude de ces fausses réactions. Les auteurs américains posent le diagnostic de fausse réaction lorsqu'en l'absence de tout signe et de tout antécédent cliniques, un individu présente les symptômes sérologiques suivants :

— Taux de réagine en général relativement bas.

— Courbe syphilimétrique quelquefois stationnaire mais présentant habituellement des évolutions irrégulières et indépendantes de la conduite du traitement dans le cas où il aurait été institué.

— Dissociation et variation possibles des résultats qualitatifs : une réaction positive peut devenir négative lors des examens qui suivent, alors qu'une autre réaction peut présenter l'évolution contraire.

OBSERVATION n° 5. — M. N..., 20 ans. Sérologie positive découverte lors d'un examen systématique par la Sécurité Sociale. Aucun signe clinique ni antécédent avoué. Une série de 20 injections de Bivator est prescrite.

Contrôle sérologique quantitatif pendant 100 jours (Cf. courbe n° 5) (les réactions qualitatives de Kolmer, Meinicke, Kahn et Kline restent toujours fortement positives).

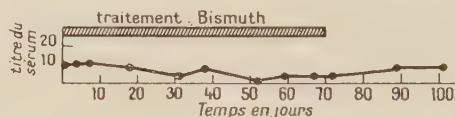


FIG. 10. — Courbe syphilimétrique n° 5 : « Fausse réaction ».

Interprétation. — Étant donné l'absence de signes cliniques, la faiblesse du titre en réagine et l'évolution irrégulière de la courbe, il semble que l'on soit en présence d'une réaction faussement positive biologique.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

La réaction quantitative décrite dans ce travail se caractérise par la mesure du pouvoir fixateur de la réagine contenue dans le sérum syphilitique pris à doses constantes et éprouvé par des doses progressivement croissantes de complément titré à 50 o/o d'hémolyse et d'antigène à la cardiolipine. Le principe essentiel dont découle le choix des doses variables d'antigène est que la réaction cardiolipine-réagine et la fixation ultérieure du complément doivent s'effectuer à leur optima, ce qui permet d'établir une relation linéaire entre la quantité d'anticorps contenue dans le sérum et celle de complément fixé mesuré à 50 o/o d'hémolyse.

TITRAGE DU COMPLÉMENT A 50 o/o D'HÉMOLYSE

L'unité de complément dite à 50 o/o d'hémolyse résulte de l'étude de la courbe d'hémolyse établie en fonction de doses variables de complément et de doses fixes d'hémolysines et de globules rouges de mouton. Cette courbe, dont la formule mathématique a pu être établie (von Krogh), présente une forme en S et permet la détermination graphique de la valeur de l'unité 50 o/o, le point d'inflexion correspondant à la quantité de complément lysant 50 o/o, de la totalité des globules rouges, c'est-à-dire l'unité 50 o/o. L'intérêt du choix de cette unité est que la mesure du complément ainsi effectuée est beaucoup plus précise que lorsqu'on utilise l'unité classique (à 100 o/o d'hémolyse). On sait que cette unité est la plus faible quantité de complément lysant totalement la dose fixe de globules rouges mis en jeu. La mesure de l'unité 100 o/o ne peut être faite exactement car cette unité correspond au point mal défini où la courbe d'hémolyse devient pratiquement parallèle à l'axe des abscisses, tandis que l'unité 50 o/o, point d'inflexion de la courbe, correspond au maximum de sensibilité de la réaction d'hémolyse. En outre, élément essentiel de mesure, la lecture de la réaction se fait non pas à l'œil nu, mais photométriquement, d'où une précision et une sensibilité accrues. L'usage du photomètre permet en outre de standardiser la suspension de globules rouges de mouton et de faire ainsi tous les titrages avec rigoureusement la même quantité d'hématics, ce qui rend les résultats indépendants de ce facteur.

Mais d'autres facteurs interviennent dans la réaction et font varier le pouvoir hémolytique du complément. Il faut déterminer dans quelles conditions ces facteurs sont les plus favorables, de manière à établir un mode

opératoire standard du titrage du complément permettant la détermination de l'unité 50 o/o dans les meilleures conditions possibles.

— Le sérum hémolytique (sérum anti-hématies de mouton) qui sensibilise les globules rouges à l'action du complément doit être rigoureusement titré.

— Les conditions physico-chimiques dans lesquelles la réaction d'hémolyse est effectuée ont aussi leur importance : le temps, la température, la teneur en électrolytes et en ion magnésium, etc..., doivent être fixés avec précision.

LA RÉACTION QUANTITATIVE DE FIXATION DU COMPLÉMENT

La réaction entre la cardioline, la réagine et le complément est soumise aux lois de formation des complexes antigène-anticorps, c'est-à-dire que la réaction peut être partiellement ou totalement inhibée si un des éléments est en excès ou en défaut par rapport aux autres (phénomène de zone). La réaction s'effectuant dans 5 tubes contenant chacun le même volume de sérum à étudier et des doses croissantes de complément mesurées en unités 50 o/o, il faut que chaque tube contienne des doses croissantes d'antigène pour qu'il n'y ait pas d'inhibition partielle de la fixation par excès ou par défaut d'antigène. Dans un temps préparatoire, le titrage de l'antigène a permis de déterminer les doses de ce réactif qu'il faut employer.

Après le temps nécessaire à la fixation du complément sur le complexe réagine-cardioline, le nombre d'unités 50 o/o fixées est déterminé de la façon suivante. En ajoutant à tous les tubes la même dose de globules rouges sensibilisés on permet au complément restant libre dans certains tubes, de manifester son activité hémolytique. Par extrapolation graphique (connaissant le nombre d'unités 50 o/o contenu dans chaque tube et le pourcentage d'hémolyse correspondant) on détermine le nombre d'unités 50 o/o permettant encore d'hémolyser 50 o/o des globules rouges. Ce nombre, diminué d'une unité, représente le nombre d'unités 50 o/o fixées par un certain volume de sérum en présence d'antigène : c'est le titre du sérum en réagine.

Cette réaction est effectuée suivant un *mode opératoire standardisé* tenant compte de l'influence de différents facteurs sur l'intensité de la fixation, en particulier le temps et la température.

APPLICATIONS DE LA RÉACTION QUANTITATIVE A LA SÉROLOGIE
DE LA SYPHILIS

Du fait de sa précision et de la relation linéaire qui existe entre le taux de réagine et le nombre d'unités 50 o/o fixées, cette réaction présente un grand intérêt pour suivre l'évolution dans le temps du taux de réagine dans le sérum d'un syphilitique. Confirmant en partie les théories de Vernes, les recherches récentes des sérologistes et des cliniciens américains mettent clairement en évidence l'intérêt majeur de la courbe quantitative pour le contrôle de l'infection syphilitique. Ces auteurs ont constaté que les variations du taux de la réagine sérique suit les lois de l'immunologie générale, donc que cette réagine se comporte comme le ferait un anticorps spécifique du tréponème.

Lorsqu'un foyer tréponémique est en activité dans un organisme neuf (syphilis récente, primo-secondaire), l'organisme répond en produisant de la réagine dont le taux dans le sang s'élève régulièrement pendant les premières semaines de la maladie, jusqu'à un maximum :

— si sous l'effet du traitement institué durant cette période, la croissance du tréponème est stoppée, la courbe de réagine décroît lentement et la réagine cesse d'être décelable dans le sérum au bout de six mois en général, que le traitement ait été continué ou non. Cette courbe sérologique représente le type normal pour un malade convenablement traité dès le début et ne présentant pas de rechute ni de réinfection ;

— si, au contraire, la croissance du tréponème reprend activement, ou si le malade se réinfecte, le taux de réagine remonte alors brusquement pendant un certain temps *avant l'apparition de tous nouveaux signes cliniques*, ce qui commande la reprise immédiate du traitement.

Dans le cas des syphilis anciennes, non traitées ou tardivement traitées et qui peuvent être « séro-résistantes » la sérologie quantitative perd progressivement de son intérêt et, au stade ultime l'organisme a acquis en quelque sorte l'habitude de produire la réagine sérique à un taux sensiblement constant même en l'absence de tout foyer tréponémique en activité (« cicatrice sérologique », « Bordet-Wassermann irréductible »).

L'évolution d'une courbe syphilimétrique établie dans de bonnes conditions techniques constitue donc pour le clinicien un test précieux qui lui permet de suivre l'évolution de la maladie. Notre but dans cette étude a été de perfectionner ce moyen d'exploration sérologique en mettant au point une technique rationnelle de fixation du complément permettant l'évaluation précise de la quantité d'anticorps contenu dans un immun-sérum.

BIBLIOGRAPHIE

1. PILLEMER (L.) et ECKER (E. E.). — *J. Biol. Chem.*, **137**, 1941, p. 139.
2. RITZ (H.). — *Z. Immunitätsf.*, **13**, 1912, p. 62.
3. GORDON (J.), WHITEHEAD (H. R.) et WORMALL (A.). — *Biochem. J.*, **20**, 1926, p. 1028.
4. PILLEMER (L.), SEIFTER (J.) et ECKER (E. E.). — *J. Immunol.*, **40**, 1941, p. 89.
5. PILLEMER (L.), ECKER (E. E.), ONGLEY (J. L.) et COHN (E. J.). — *J. Experim. Med.*, **74**, 1941, p. 297.
6. PILLEMER (L.). — *Chem. Revs.*, **33**, 1943, p. 1.
7. BORDET (J.). — *Traité de l'Immunité dans les maladies infectieuses*, 2^e édition, Masson, Paris, 1939.
8. BORDET (J.) et GENGOU (O.). — *Ann. Inst. Pasteur*, **15**, 1901, p. 289.
9. VON KROGH (M.). — *J. Infect. Dis.*, **19**, 1916, p. 452.
10. MORSE (S.). — *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, **19**, 1921-1922, p. 17.
11. WADSWORTH (A.), MALTANER (E.) et MALTANER (F.). — *J. Immunol.*, **21**, 1931, p. 313.
12. KENT (J. F.), BUKANTZ (S. C.), REIN (C. R.). — *J. Immunol.*, **53**, 1946, p. 37.
13. MORRIS (M. C.). — *J. Immunol.*, **62**, 1949, p. 201.
14. KENT (J. F.). — *Science*, **105**, 1947, p. 316.
15. THOMPSON (W. R.) et MALTANER (F.). — *J. Immunol.*, **38**, 1940, p. 147.
16. MAYER (M. M.), EATON (B. B.) et HEIDELBERGER (M.). — *J. Immunol.*, **53**, 1946, p. 31.
17. EAGLE. — *J. of Exper. Med.*, **52**, 1930, p. 747.
18. LAPORTE et HARDRE DE LOOZE. — *C. R. Soc. Biol.*, **142**, 1948, p. 489.
19. KENT (J. F.). — *J. Lab. and Clin. Med.*, **31**, 1946, p. 1270.
20. KENT (J. F.). — *Science*, **105**, 1947, p. 306.
21. MAYER (M. M.), CROFT (C. C.) et GRAY (M. M.). — *J. Exper. Med.*, **88**, 1948, p. 427.
22. MAYER (M. M.), OSLER (A. G.), BIER (O. G.) et HEIDELBERGER (M.). — *J. Exper. Med.*, **84**, 1946, p. 535.
23. FRIEDEWALD (W. F.). — *J. Exper. Med.*, **78**, 1943, p. 347.
24. HEIDELBERGER (M.). — *Science*, **92**, 1940, p. 534.
25. HEIDELBERGER (M.) et MAYER (M.). — *J. Exper. Med.*, **75**, 1942, p. 285.
26. WADSWORTH (A.), MALTANER (E.) et MALTANER (F.). — *J. Immunol.*, **35**, 1938, p. 93.
27. WADSWORTH (A.), MALTANER (E.) et MALTANER (F.). — *J. Immunol.*, **35**, 1938, p. 105.
28. WADSWORTH (A.), MALTANER (E.) et MALTANER (F.). — *J. Immunol.*, **35**, 1938, p. 217.
29. RICE (C. E.). — *Am. Assoc. Adv. Sc.*, **64**, 1939, Publ. n° 11.
30. RICE (C. E.). — *J. Immunol.*, **43**, 1942, p. 129.
31. PUTNAM (F. W.), WOLKIN (E.), CRAIG (H. W.) et NEURATH (H.). — *Am. J. Syph. Gonorr. and Ven. Dis.*, **31**, 1947, 457.
32. PANGBORN (M. C.). — *J. Biol. Chem.*, **143**, 1942, p. 247.
33. PANGBORN (M. C.). — *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **48**, 1941, p. 484.
34. RICE (C. E.). — *J. Immunol.*, **55**, 1947, p. 1.
35. THOMPSON (W. R.), RICE (C. E.), MALTANER (E.) et MALTANER (F.). — *J. Immunol.*, **62**, 1949, p. 353.
36. MALTANER (E.) et MALTANER (F.). — *J. Immunol.*, **51**, 1945, p. 195.
37. HAZEN (E. L.). — *J. Immunol.*, **46**, 1943, p. 341.
38. GOLDSWORTHY (N. E.). — *J. Path. Bact.*, **31**, 1928, p. 220.

39. PILLEMER (L.) et al. — *J. Exper. Med.*, **76**, 1942, p. 93.
40. PILLEMER (L.), CHU (F.), SEIFTER (S.) et ECKER (E. E.). — *J. Immunol.*, **45**, 1942, p. 51.
41. PILLEMER (L.), SEIFTER (S.) et ECKER (E. E.). — *J. Exper. Med.*, **75**, 1942, p. 421.
42. HEIDELBERGER (M.), BIER (O. G.) et MAYER (M.). — *Federation Proceedings*, Part. II, **1**, 1942, p. 178.
43. HEGEDUS (A.) et GREINER (H.). — *Ztschft. f. Immunitätsf.*, **92**, 1937, p. 1.
44. VERNES (A.). — *Mesure et Médecine*, Flammarion, Paris, 1943.
45. VOGELSANG (Th. M.). — *Séro-diagnostic de la syphilis*. Bergen, 1940.
46. NELSON (R. A.) et MAYER (M. M.). — *J. Exper. Med.*, **89**, 1949, p. 369.
47. BOYD (W. C.). — *Fundamentals of Immunology*, 2^e édition. New-York, 1947.
48. EAGLE (H.) et HOYAN (R. B.). — *J. Exper. Med.*, **71**, 1940, p. 215.
49. THOMAS (E. W.) et MAHONEY (J. F.). — *Syphilis*. The Macmillan Company, New-York, 1949.
50. THOMAS (E. W.). — *Am. J. Syph. Gonorr. and Ven. Dis.*, **30**, 1946, p. 317.
51. MAILLARD (E. R.) et ORZEL (A.). — *Am. J. Syph. Gonorr. and Ven. Dis.*, **30**, 1946, p. 490.
52. MAILLARD (E. R.) et ORZEL (A.). — *Am. J. Syph. Gonorr. and Ven. Dis.*, **31**, 1947, p. 506.
53. WADSWORTH (A. B.). — *Trans. Amer. Phys.*, **59**, 1946, p. 259.
54. JOULIA et LAPORTE. — *Semaine des Hôpitaux* à paraître.
55. NELSON (R. A.) et al. — *Am. J. Syph. Gonorr. and Ven. Dis.*, **34**, 1950, p. 101.
56. ROULIER (P.). — *C. R. Soc. Biol.*, **143**, 1949, p. 457.
57. FAURE (M.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **30**, 1948, p. 533.
58. FAURE (M.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **32**, 1950, p. 503.
-

VU ET APPROUVÉ :

Montpellier, le 8 novembre 1950.

Le Doyen de la Faculté de Pharmacie,
E. CANALS.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de Montpellier,
P. GUILLOU.

